

555,099

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale
2 décembre 2004 (02.12.2004)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/104580 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/53, 33/543, B01J 19/00

(FR). MARCHAND, Gilles [FR/FR]; 1, rue Traversine,
F-38350 LA MURE D'ISERE (FR). REVOL-CAVA-
LIER, Frédéric [FR/FR]; 11, rue de la Saulne, F-38180
SEYSSINS (FR). VINET, Françoise [FR/FR]; 22, boule-
vard Edouard Rey, F-38000 GRENOBLE (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050195

(74) Mandataire : LEHU, Jean; BREVATOME, 3, rue du
Docteur Lancereaux, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international : 17 mai 2004 (17.05.2004)

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,

(26) Langue de publication : français

[Suite sur la page suivante]

(30) Données relatives à la priorité :
0350166 21 mai 2003 (21.05.2003) FR

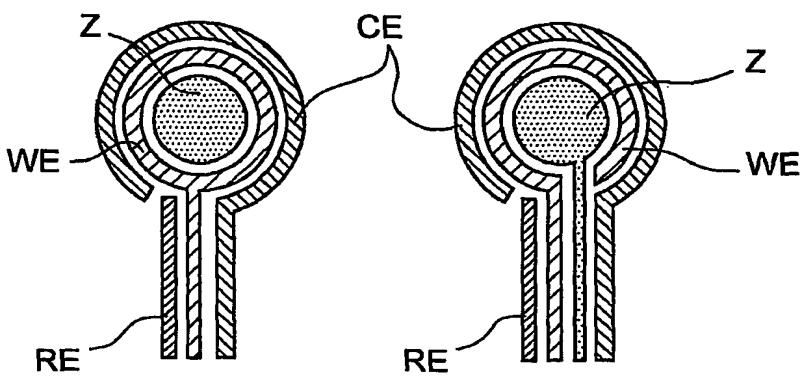
(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75752 PARIS 15ème (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ES-
COFFIER, Céline [FR/FR]; 4, rue Turgot, F-21000 Dijon

(54) Title: DEVICE AND METHODS FOR COUPLING/ UNCOUPLING A TARGET OR AN OBJECT PRESENT IN A SAM-
PLE

(54) Titre : DISPOSITIF ET PROCEDES D'ACCROCHAGE/DECROCHAGE D'UNE CIBLE OU D'UN OBJET PRESENT
DANS UN ECHANTILLON



(57) Abstract: The inventive device comprises a support having a surface comprising a coupling zone (Z) which can be functionalized by a probe (A) which can become reversibly linked according to pH to a target (B) in order to couple therewith; a working electrode (WE) and a control electrode (CE) for said working electrode disposed on the support in the vicinity of the coupling zone; and means enabling an electric current or a determined potential to be applied to the working electrode in order to result in a local variation in the pH in said coupling zone when the coupling zone and electrodes are immersed in an aqueous solution.

aqueous solution. According to the invention, the method for coupling and/or decoupling a target or an object uses said device. Coupling and/or decoupling is electrochemically controlled with the working electrode.

WO 2004/104580 A1

(57) Abrégé : Le dispositif de l'invention comprend un support ayant une surface comportant une zone d'accrochage (Z) susceptible d'être fonctionnalisée par une sonde (A) capable de se lier, en fonction du pH et de façon réversible, à une cible (B) pour l'accrocher ; une électrode de travail (WE) et une contre électrode (CE) de cette électrode de travail disposées sur le support au voisinage de la zone d'accrochage ; et des moyens permettant d'appliquer un courant électrique ou un potentiel déterminé à ladite électrode de travail de manière à provoquer, lorsque ladite zone d'accrochage et lesdites électrodes sont immergées dans une solution aqueuse, une variation locale de pH au niveau de ladite zone d'accrochage. Le procédé d'accrochage et/ou de décrochage d'une cible ou d'un objet selon l'invention utilise ce dispositif, l'accrochage et/ou le décrochage étant commandé(s) électrochimiquement avec l'électrode de travail.



GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**DISPOSITIF ET PROCEDES D'ACCROCHAGE/DECROCHAGE D'UNE
CIBLE OU D'UN OBJET PRESENT DANS UN ECHANTILLON**

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte à un dispositif et à des procédés d'accrochage ou de décrochage d'une cible ou d'un objet présent dans un échantillon sur une sonde fixée sur un support.

10 La cible peut par exemple être choisie dans le groupe constitué d'une molécule chimique ou biologique, une cellule, d'une bactérie, d'une particule fonctionnalisée, telle qu'une bille de latex ou une bille de verre, d'une protéine, d'un acide
15 désoxyribonucléotidique (ADN ou ADNc), d'un oligonucléotide, d'un acide ribonucléotidique, d'un acide nucléique de peptide (« PNA » pour « peptide nucleic acid » en anglais), d'une enzyme, d'une molécule à transfacter, d'un principe actif par exemple
20 d'intérêt pharmacologique, etc. La sonde peut être par exemple une molécule chimique ou biologique ou un objet biologique capable de se lier à la fois au support et à la cible. L'objet peut être un des éléments précédés, il est « porté » par la cible.

25 L'invention trouve des applications dans de très nombreux domaines par exemple dans des procédés de séparation ou purification de molécules ou d'objets biologiques, dans des procédés de concentration de molécules ou d'objets biologiques, dans des procédés de
30 détection, etc.

L'invention s'applique à l'ensemble des microsystèmes utilisant l'accrochage et le décrochage de cibles ou d'objets biologiques et/ou chimiques. Elle peut s'appliquer notamment aux microsystèmes pour la 5 biologie, par exemple aux puces à ADN, aux puces de tri cellulaire ; aux microsystèmes chimiques, par exemple activation de fonctionnalisation ou puces de détection ; ou de chimie combinatoire, par exemple ciblage de molécules actives.

10

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

Dans le texte ci-dessous, les références entre crochets [] renvoient à la liste de références annexée.

La plupart des systèmes et techniques actuels 15 utilisent des processus autres que l'électrochimie. Typiquement, ces techniques exploitent soit des interactions physiques telles que des interactions électrostatiques, hydrophile/hydrophobe, stériques, topographiques, physisorption, etc., soit dépendent 20 d'un processus chimique. Quelques systèmes font appel à des procédés que l'on peut qualifier « d'actifs » car une commande électrique, électrochimique ou photochimique, intervient dans la modulation des propriétés de surface. De manière générale, la 25 combinaison accrochage/décrochage des molécules par ces systèmes n'est pas réversible ni contrôlable car ceux-ci sont souvent passifs et/ou non spécifiques.

Parmi les systèmes d'accrochage et de décrochage de molécules sur une surface, adaptés à des 30 applications biologiques et/ou chimiques, certains utilisent des modifications des propriétés de surface.

On peut citer par exemple l'altération électrochimique d'un groupement actif présent sur une surface suivie d'une réaction chimique : protonation/déprotonation de groupes acides et/ou bases
5 en terminaison de couches auto assemblées de thiols, couples redox de type $X^{(-)}/XH$, en surface ou en solution, pour provoquer une déprotection. De tels systèmes sont décrits par exemples dans les références [1] et [2] citées en annexe. Dans ces systèmes, les
10 couples redox utilisés sont relativement complexes et les solvants employés pour la synthèse chimique sont le plus souvent non aqueux ce qui conduit inévitablement à une limitation du spectre d'utilisation. Il s'agit par exemple d'une réduction ou oxydation électrochimique
15 conduisant à une réaction chimique, par exemple, réduction d'une quinone en hydroquinone suivie d'une lactonisation (décrochage de ligands ou de cellules) ou encore oxydation d'une hydroquinone en quinone suivie d'une réaction de Diels-Alder (immobilisation de
20 ligands ou de cellules) comme cela est décrit dans la référence [2].

Ces techniques, en partie électrochimiques, ne permettent malheureusement pas de disposer d'un accrochage réversible puisqu'elles sont couplées à une
25 réaction chimique irréversible : chimie de synthèse comme le montre le document de référence [3].

On peut citer également les systèmes utilisant l'activation photochimique d'un groupement présent sur une surface tels que ceux décrits dans les références
30 [2] et [4]. Ces systèmes utilisent un changement de la conformation du groupement par isomérisation induit par

voie photonique et une réaction avec, ou une reconnaissance par, le produit photo activé tel qu'une enzyme, un anticorps, un ligand ou des groupements chimiques [5].

5 L'accrochage des objets, dans ce cas, peut malheureusement conduire à un accrochage non spécifique [2] et nécessite un banc optique et un système d'activation complexe et délicat à mettre en œuvre.

On peut citer aussi les techniques utilisant un
10 changement de comportement hydrophile / hydrophobe d'une surface recouverte de polymères particuliers (« LCST » : « Lower Critical Solution Temperature ») comme cela est décrit dans le document [6]. Ces polymères passent d'un état à l'autre si leur
15 température est inférieure ou supérieure à une température critique (vers 37°C). Ceci permet, par attraction/répulsion hydrophile/hydrophobe d'accrocher ou de décrocher des objets (ayant des propriétés hydrophiles ou hydrophobes) par refroidissement (ou
20 réchauffement).

Cependant, pour des objets de grande taille à l'échelle des microsystèmes, par exemple des cellules, le détachement s'accompagne d'une importante inertie de réaction. En outre, l'intégration de ces polymères à un
25 microsystème nécessite encore de nombreux efforts de recherche et d'adaptation aux procédés de micro technologies [7].

On peut aussi citer les systèmes utilisant la fonctionnalisation d'une surface avec des groupements
30 pouvant effectuer une reconnaissance chimique et/ou stérique avec un autre groupement présent sur l'objet à

ancrer [8], [9] et [10]. Ces systèmes immobilisent des fonction chimiques ou biologiques telles que des groupements acide carboxyle, amine, hydroxyle, etc. ou oligonucléotides, par couches auto assemblées de thiols 5 (« SAM ») fonctionnalisés, par silanisation ou par polymères conducteurs fonctionnalisés, par greffage de complexes métallo-organiques, ou encore de molécules cages [11].

Malheureusement, dans ces systèmes, 10 l'accrochage et le décrochage ne peuvent être ni commandés ni effectués localement. Ces systèmes manquent donc de précision.

On peut citer également les systèmes utilisant une action électrique, électrostatique comme cela est 15 décrit dans la référence [12]. Ces systèmes utilisent par exemple un champ électrique pour séparer deux parties d'un assemblage moléculaire porteur de charges [13], une désorption cathodique (répulsion électrostatique) [14] ou un accrochage ou décrochage 20 d'objets chargés pour maintenir l'électroneutralité de la zone d'accrochage ou de décrochage ou à l'intérieur d'une membrane (volume).

Ces techniques n'offrent cependant pas de réelle spécificité et tout objet porteur de charge sera 25 simultanément attiré/repoussé. La réversibilité de cette approche vis-à-vis d'objets complexes et de volume important à l'échelle des microsystèmes, par exemple, une cellule, une bactérie, n'est pas acquise. Dans le cas du maintien de l'électroneutralité d'une 30 membrane, la taille des objets pouvant être immobilisés est un facteur limitant.

Il existe donc un réel besoin d'un système qui ne présente pas les nombreux problèmes des systèmes précités de l'art antérieur.

5 Exposé de l'invention

Le système de la présente invention, sous la forme d'un dispositif et de procédés utilisant ce dispositif, permet précisément d'apporter une solution à ces nombreux problèmes de l'art antérieur. En 10 particulier, il utilise des solutions aqueuses, il peut être réversible, spécifique, précis, reproductible, simple à mettre en œuvre, il permet de s'adapter aussi bien à l'accrochage de cibles ou d'objets de grande taille tels que des cellules qu'à des cibles ou objets 15 de petite taille tels que des molécules chimiques, il s'adapte aisément aux procédés de microtechnologies, et il permet une commande et une mise en œuvre locale. En outre, l'activation du dispositif pour 20 l'accrochage/décrochage possède une faible inertie de réaction.

Dans la suite de la description, le terme « cible » sera réservé aux molécules ou objets qui se lient directement à la sonde pour former une liaison sonde-cible. Le terme « objet » sera réservé aux 25 molécules ou objets qui sont accrochés sur la sonde par l'intermédiaire de la « cible » en formant avec ladite cible une liaison objet-cible. Autrement dit l'objet ne se lie pas directement à la sonde, mais par l'intermédiaire de la cible qui est reconnue par la 30 sonde.

Les figures 1 et 2 annexées représentent schématiquement un dispositif selon l'invention.

Le dispositif de la présente invention est un dispositif permettant l'accrochage ou le décrochage 5 localisé d'une cible (B) sur une sonde (A) fixée sur un support.

Il comprend :

- un support ayant une surface comportant une zone d'accrochage (Z) susceptible d'être 10 fonctionnalisée par une sonde (A) capable de se lier à une cible (B) pour l'accrocher ;

- une électrode de travail (WE) et une contre électrode (CE) de cette électrode de travail disposées sur le support au voisinage de la zone d'accrochage ; 15 et

- des moyens permettant d'appliquer un courant électrique ou un potentiel déterminé à ladite électrode de travail de manière à provoquer, lorsque 20 ladite zone d'accrochage et lesdites électrodes sont immergées dans une solution aqueuse, une variation locale de pH au niveau de ladite zone d'accrochage.

Le procédé de l'invention est, suivant un premier mode de réalisation, un procédé d'accrochage 25 d'une cible (B) présente dans un échantillon aqueux à une sonde (A), ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) mise en contact de l'échantillon aqueux avec la zone d'accrochage d'un dispositif selon 30 l'invention, ladite zone d'accrochage étant

fonctionnalisée par la sonde (A) capable de se lier, en fonction du pH, à la cible (B) pour l'accrocher ;

5 b) application d'un courant électrique ou d'un potentiel à l'électrode de travail dudit dispositif de façon à modifier localement, au niveau de ladite zone d'accrochage, le pH de l'échantillon aqueux pour que la sonde reconnaissse et se lie spécifiquement à la cible pour l'accrocher.

10 Le procédé de l'invention est, suivant un deuxième mode de réalisation, un procédé d'accrochage et de décrochage d'une cible (B) présente dans un échantillon aqueux sur une sonde (A), ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

15 a') mise en contact de l'échantillon aqueux comprenant la cible (B) avec la zone d'accrochage d'un dispositif selon la présente invention, ladite zone d'accrochage étant fonctionnalisée par la sonde (A), pour que la cible (B) s'accroche à ladite sonde ;

20 b') application d'un courant électrique ou d'un potentiel à l'électrode de travail dudit dispositif de façon à modifier localement, au niveau de ladite zone d'accrochage, le pH de la solution de travail pour que la cible (B) se décroche de la sonde (A).

25 L'échantillon aqueux est une solution aqueuse comprenant la cible à accrocher sur la sonde. Il provient par exemple d'un simple mélange de la cible à une solution aqueuse, ou d'un prélèvement effectué sur
30 un animal, une plante, dans un milieu de culture, dans un réacteur de culture biologique (culture cellulaire,

levures, champignons, algues, enzymes, etc.), dans un réacteur chimique, d'un gaz (par exemple l'air ambiant) ou à partir d'un effluent industriel liquide ou gazeux. Si ce prélèvement ne permet pas de mettre en œuvre le 5 procédé de l'invention, par exemple du fait de sa nature (gaz, solide), de sa concentration ou des éléments qu'il contient (résidus solides, déchets, suspension, molécules interférentes, etc.) le procédé de l'invention comprend en outre une étape préalable de 10 mise en solution aqueuse du prélèvement par les techniques connues de l'homme du métier. L'essentiel est que l'échantillon auquel est appliqué le procédé de l'invention soit aqueux.

En effet, dans la présente invention, l'eau 15 présente dans l'échantillon peut subir soit une oxydation soit une réduction suivant les conditions électrochimiques (courant ou potentiel) appliquées à l'électrode de travail. Les couples mis en jeu, O_2/H_2O et H_2O/H_2 , ont des potentiels respectifs déterminés par 20 $E_1 = 1,23 - 0,06pH$, et $E_2 = - 0,06pH$. Le pH initial de la solution de travail, ainsi que l'immunité cinétique des réactions, dépendant de l'électrolyte et des électrodes utilisées, détermine le potentiel de travail permettant d'obtenir la variation de pH désirée. La 25 zone d'immunité cinétique est la zone de potentiel supérieure au potentiel théorique (donné par les équations ci-dessus) dans laquelle aucune réaction ne se produit, contrairement à ce que prédit la théorie. Il est donc nécessaire d'appliquer une surtension pour 30 vaincre l'immunité cinétique. Par exemple, sur

électrode de platine, la surtension cathodique de - 0,2 V et la surtension anodique de 0,6 V.

Dans la présente invention, le processus d'accrochage implique la formation d'un pont chimique entre la sonde et sa cible : soit par une variation locale du pH au moyen du dispositif de l'invention, le milieu au voisinage de la zone d'accrochage étant rendu localement acide ou basique par activation électrochimique suivant le premier mode de réalisation de l'invention (« accrochage actif »); soit spontanément, par exemple du fait du pH de la solution aqueuse de travail, du fait d'une affinité chimique ou biologique entre la sonde et la cible, du fait d'une reconnaissance stérique, etc., lors de la mise en contact sonde-cible suivant le deuxième mode de réalisation de l'invention (« accrochage passif »). La formation de ce pont chimique s'effectue entre deux groupements, dont l'un appartient à la sonde immobilisée à la surface de la zone d'accrochage, et l'autre à la cible.

Ainsi, suivant le choix du mode de réalisation de l'invention, lorsque la cible est présente dans l'échantillon, elle est accrochée par la sonde sur la zone d'accrochage soit grâce à la variation locale du pH induite au niveau de ladite zone d'accrochage par la microcellule électrochimique, soit spontanément.

Dans le premier mode de réalisation de l'invention, et lorsque la liaison sonde-cible est réversible, par exemple en fonction du pH, la cible peut être libérée de la sonde par exemple en appliquant une étape consistant à interrompre l'application du

courant électrique ou du potentiel à l'électrode de travail ou à appliquer un courant électrique ou un potentiel différent à ladite électrode de travail de façon à modifier localement le pH de la solution de travail ou d'une solution de rinçage afin que la cible se décroche de la sonde. Dans ce cas, le procédé de l'invention comprend donc un accrochage et un décrochage « actif » de la cible. Par exemple, on peut appliquer à l'électrode de travail un courant ou un potentiel permettant de revenir à la valeur initiale de pH ou à une valeur permettant la libération de la cible.

Dans le premier mode de réalisation de l'invention, et lorsque la liaison sonde/cible est réversible, la cible peut aussi être libérée en utilisant une solution de rinçage qui rompt la liaison sonde-cible, par exemple du fait du pH ou de la nature chimique de cette solution de rinçage.

Une ou plusieurs étapes de rinçage de la zone d'accrochage, avant et/ou après l'étape b) peut (peuvent) également être réalisée(s), ceci par exemple à des fins de purification de la cible fixée sur la sonde. La solution de rinçage est alors bien entendu de préférence une solution qui préserve la liaison sonde-cible. Cette solution peut par exemple être identique à la solution aqueuse qui a permis la préparation de l'échantillon.

Selon une variante du deuxième mode de réalisation, l'accrochage de la cible par la sonde dans l'étape a') peut être réalisé par application d'un courant électrique ou d'un potentiel à l'électrode de

travail dudit dispositif de façon à modifier localement, au niveau de ladite zone d'accrochage, le pH de la solution de travail pour que la cible (B) s'accroche à ladite sonde (A). Dans ce cas,
5 l'accrochage et le décrochage de la cible sont dits « actifs ». Suivant cette variante, l'accrochage peut être réalisé suivant le premier mode de réalisation de l'invention, et le décrochage peut être réalisé suivant le deuxième mode de réalisation de l'invention.

10

Les documents précités de l'art antérieur montrent qu'une approche purement électrochimique conforme à la présente invention, c'est-à-dire sans couplage avec un autre type de réaction non réversible,
15 n'a jamais été abordée dans les techniques de l'art antérieur dans le but de contrôler et de faire varier les propriétés d'accrochage et/ou de décrochage d'une cible sur une surface fonctionnalisée par une sonde, par exemple d'un microsystème.

20

Le dispositif peut avantageusement être sous la forme d'un microsystème comportant un ou plusieurs dispositif(s) selon l'invention. Chaque dispositif forme une véritable microcellule électrochimique comprenant au moins deux électrodes : une électrode de travail et une contre-électrode ; et éventuellement une électrode de référence (RE) ; ainsi qu'une zone d'accrochage et/ou de décrochage. Cette dernière peut elle aussi être une électrode, par exemple lorsque sa fonctionnalisation avec la sonde est réalisée de
25 manière électrique ou électrochimique, par exemple par électrogreffage.
30

Selon l'invention, une microcellule électrochimique pour une zone d'accrochage et/ou de décrochage est préférable afin d'obtenir une bonne localisation de la variation de pH, et donc un
5 accrochage bien localisé des cibles. Ainsi, le dispositif de l'invention permet de mettre en œuvre un procédé d'accrochage et/ou de décrochage localisé dans lequel il est possible de choisir spécifiquement, précisément, et indépendamment les unes des autres, la
10 (ou les) zone(s) où une cible est à accrocher ou à décrocher, parmi une matrice de plusieurs zones potentielles d'accrochage et/ou de décrochage réparties à la surface d'un microsystème et fonctionnalisées avec une ou plusieurs sondes identiques ou différentes.

15 Le support, sur lequel le dispositif de la présente invention peut être fabriqué, peut être un quelconque support permettant de mettre en œuvre la présente invention. Il peut s'agir par exemple d'un support de biopuce tel que ceux classiquement utilisés,
20 par exemple en silicium, en verre, en polymère, en métal, en plastique, etc. Des supports utilisables dans la présente invention sont décrits par exemple dans les documents référencés [15] et [16] dans la liste de référence.

25 La zone d'accrochage et/ou de décrochage peut être avantageusement constituée d'un matériau conducteur si une fonctionnalisation électrique ou électrochimique est nécessaire. Elle peut être constituée de tout autre matériau utilisable pour
30 greffer la sonde si d'autres techniques de fonctionnalisation sont choisies, par exemple des

techniques de fonctionnalisation chimiques. Il peut d'un matériau modifié chimiquement ou biologiquement pour que la sonde puisse être fixée dessus. Il peut s'agir de la surface même du support ou d'un
5 revêtement, déposé sur ce support par les techniques habituelles de dépôt connues de l'homme du métier, permettant la fonctionnalisation par la sonde. Ce revêtement peut être par exemple du Si, du verre, du SiO₂ (permettant une silanisation), un polymère ou un
10 copolymère conducteur approprié tels que ceux utilisés pour la fabrication de biopuces, en particulier pour la fixation de sondes moléculaires de biopuces, par exemple du polypyrrole, un métal, tel que Au, Ag, Pt, par exemple pour réaliser un électrogreffage, pour la
15 formation de monocouches auto assemblées, etc. La zone d'accrochage peut être délimitée par exemple par la localisation des sondes qui la fonctionnalisent, et par le voisinage des électrodes.

Le dispositif de la présente invention peut se
20 présenter, par exemple à des fins de commercialisation, comme un substrat comportant une zone d'accrochage non fonctionnalisée et les électrodes. L'utilisateur de ce dispositif peut alors aisément, au moyen des techniques classiques de fonctionnalisation de surface de biopuces, fonctionnaliser cette zone avec une sonde qu'il a choisie en fonction de la cible qu'il désire accrocher pour obtenir un dispositif permettant de mettre en œuvre un des procédés de l'invention.
25

Le dispositif de la présente invention peut
30 aussi se présenter, à des fins de commercialisation, comme comportant déjà sa zone d'accrochage

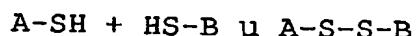
fonctionnalisée par une sonde (A) capable de se lier, en fonction du pH, à la cible (B) pour l'accrocher. Il permet alors de mettre en œuvre un des procédés de l'invention immédiatement, sans fonctionnalisation préalable de la zone d'accrochage/décrochage, pour la cible correspondant à ladite sonde.

De manière générale, la fonctionnalisation de la zone d'accrochage par la sonde, qui consiste en une immobilisation de la sonde sur la zone d'accrochage, peut être réalisée au moyen des techniques habituelles de greffage chimiques ou électrochimiques (« électrogreffage »), par exemple telles que celles décrites dans les documents référencés [8] à [12] et [17] et [18] dans la liste de référence annexée.

Les figures 1 et 2 annexées représentent une zone d'accrochage (Z) fonctionnalisée par une sonde « A », par exemple biologique ou chimique.

La sonde est de manière générale choisie en fonction de la cible. La sonde « A » et la cible « B » (voir figures 1 et 2) sont composées d'un ou plusieurs éléments ayant de préférence des liaisons stables en pH et possédant des groupements chimiques pouvant interagir et s'accrocher en présence d'un pH acide ou basique lors de l'accrochage par voie électrochimique. Par exemple, la sonde « A » peut être porteur d'un (ou plusieurs) groupement(s) électrophile(s) pouvant réagir, en milieu acide ou basique, avec un (ou plusieurs) groupement(s) nucléophile(s) porté(s) par la cible « B » et vice versa. La liaison entre la sonde « A » et la cible « B » peut également consister en la

formation d'un (de) pont(s) disulfure(s) par acidification du milieu suivant la réaction



Ainsi, selon l'invention, la sonde peut être
5 choisie par exemple telle qu'elle est capable de se lier à la cible pour l'accrocher au moyen d'un groupement électrophile, par exemple choisi parmi des fonctions aldéhyde, halogénure, thiocyanate, isocyanate, ester activé, carbamate, époxyde, etc.

10 La sonde peut aussi être choisie telle qu'elle est capable de se lier à la cible pour l'accrocher au moyen d'un groupement nucléophile, par exemple choisi parmi les fonctions amine, alcoolate, phénol, phénate, oxyamine, hydrazine, etc. Selon l'invention, la sonde
15 peut être choisie par exemple de manière à ce qu'elle puisse former, dans la solution de travail, avec la molécule cible pour l'accrocher, une liaison choisie parmi une liaison hydrogène, peptidique, amide, sulfonamide, ester d'acide carboxylique, ester d'acide
20 sulfonique, silanoate substitué.

De manière générale, selon l'invention, la sonde peut être choisie parmi un acide désoxyribonucléotidique (ADN ou ADNc), un oligonucléotide, un acide ribonucléotidique, un acide
25 nucléique de peptide (PNA), une protéine, un enzyme, un substrat d'enzyme, un récepteur hormonal, une hormone, un anticorps, un antigène, une cellule eucaryote ou procaryote ou des fragments de telles cellules, une algue, un champignon microscopique, etc. Le choix se
30 fait en fonction de la cible. Par exemple, dans le groupe précité, la cible peut être un oligonucléotide

complémentaire à l'oligonucléotide sonde, un substrat d'enzyme, un anticorps spécifique d'un antigène, etc.

La localisation de l'accrochage de la cible sur la sonde de la zone d'accrochage peut être déterminée
5 par un accrochage spécifique lorsque l'assemblage sonde-cible possède une complémentarité unique. Il peut s'agir par exemple d'un accrochage sonde-cible qui exploite la complémentarité de séquence de deux brins oligonucléotidiques, par exemple d'ARN ou d'ADN, un des
10 deux brins étant fixé sur le support pour former la zone d'accrochage fonctionnalisée, l'autre brin constituant la cible à accrocher. La liaison entre la sonde et la cible se fait alors sous la forme d'un appariement des bases complémentaires des deux brins.
15 Il peut s'agir d'autres couples de molécules biologiques, que des oligonucléotides complémentaires entre eux, connus de l'homme du métier mettant en jeu des liaisons sensibles au pH, par exemple choisis dans la liste précitée, par exemple substrat/enzyme,
20 anticorps/antigène, hormone/récepteur, etc. Cette possibilité d'accrochage spécifique permet avantageusement un choix précis du point d'accrochage pour un objet donné.

Selon une variante des deux modes de
25 réalisation précités de la présente invention, également représenté sur la figure 1, la cible « B » peut être utilisée pour porter un objet « C », par exemple un objet à accrocher et/ou décrocher qui doit être extrait d'un échantillon, un objet à isoler, un
30 objet à décrocher avec une temporisation, etc.

Cet objet peut être attaché à la cible « B » antérieurement, simultanément ou postérieurement à l'assemblage de « A » + « B ». Si B porte un objet « C », ce dernier est alors accroché et/ou décroché par 5 l'intermédiaire de « B » sur A. Aucun autre phénomène électro-généré, tel que le champ électrique, n'intervient lors de l'accrochage par voie électrochimique de l'objet « C » par exemple à la surface d'un microsystème.

10 Ainsi, selon l'invention, dans l'un ou l'autre des modes de réalisation, le procédé peut comprendre en outre l'étape suivante : (x) fixation d'un objet sur la cible.

Cette variante présente notamment l'avantage 15 que, pour un couple sonde/cible déterminé, par exemple pour lequel les conditions d'accrochage/décrochage selon l'invention sont bien connues et maîtrisées, par exemple un couple sonde/cible sous la forme de brins oligonucléotidiques complémentaires ou sous une des 20 formes présentées dans les exemples ci-dessous, il est possible d'accrocher/décrocher l'un quelconque des objets précités suivant le procédé de l'invention, pourvu qu'une liaison puisse être formée entre l'objet et la cible, et que ce couple cible/objet, puisse être 25 accroché/décroché sur/de la sonde par le procédé de l'invention qui est mis en œuvre.

Cette variante présente en outre l'avantage que lorsqu'un objet doit être accroché/décroché suivant le procédé de l'invention, et qu'il n'est pas possible 30 chimiquement d'établir une interaction électrochimique directe de l'objet avec la sonde (l'objet serait alors

une cible au sens de la présente invention), l'objet est en quelque sorte « porté » par la cible, et c'est cette dernière qui interagit avec la sonde pour s'accrocher ou se décrocher sur/de la zone
5 d'accrochage. Il suffit alors de fixer l'objet sur la cible par l'un quelconque des procédés connus de l'homme du métier.

De préférence, l'objet « C » étant déterminé, on choisira un couple sonde-cible dont la
10 reconnaissance et la liaison ne sera pas gênée et/ou empêchée par la fixation de l'objet « C » sur la cible. Inversement, pour un couple sonde-cible déterminé, on choisira l'objet « C » de manière à ce que sa fixation sur la cible ne gêne pas et/ou n'empêche pas la liaison
15 sonde-cible.

L'objet « C » peut être par exemple choisi dans le groupe constitué d'une molécule, d'une cellule ; d'une bactérie ; de billes fonctionnalisées, par exemple de billes de latex, de verre, etc., ; d'une
20 protéine ; d'une enzyme ; d'un anticorps, par exemple afin de reconnaître et d'immobiliser une cellule ; d'un fragment biologique; de molécules à transfacter ; de molécules d'intérêt biologique ; de principes actifs ;
25 de molécules d'intérêt pharmacologique ; groupements chimiques, etc. L'objet « C » peut également être une molécule ou un objet tel que la cible « B ».

A titre illustratif, l'objet « C » peut être un marqueur destiné à mettre en évidence la liaison sonde-cible. Il peut s'agir par exemple d'un quelconque des
30 marqueurs connus de l'homme du métier utilisés pour mettre en évidence des molécules chimiques ou

biologiques ou des réactions de reconnaissance moléculaire entre une sonde et sa cible sur une biopuce. Il peut s'agir par exemple d'une molécule fluorescente, d'une molécule électroactive, etc. Un 5 exemple d'un tel assemblage est donné ci-dessous.

Dans l'étape précitée d'accrochage d'un objet sur la cible, l'objet étant un marqueur, le procédé de l'invention peut comprendre en outre une étape de détection de la cible marquée. Les marqueurs précités 10 étant connus, il n'est pas nécessaire de rappeler ici les techniques connues de l'homme du métier pour détecter un marqueur.

Dans les procédés de la présente invention, la 15 sonde peut également porter une molécule telle qu'un marqueur, par exemple pour mettre en évidence la liaison sonde-cible, pourvu que cette molécule ne gêne pas ladite liaison. Cette molécule peut être fixée sur la sonde par les techniques habituelles de chimie, 20 avant ou après la fonctionnalisation de la zone d'accrochage par la sonde. Par exemple, lorsque cette molécule est un marqueur, elle peut être choisie parmi une molécule chimique (par exemple la dioxygénine), un fluorophore (par exemple la fluorescéine, un 25 « molecular beacon » et son marqueur fluorescent), une molécule active électrochimiquement (par exemple le ferrocène), une molécule active biologiquement (par exemple une enzyme), un marqueur radioactif (par exemple contenant un ou des isotope(s) du phosphore 30 [P32]). Dans un autre exemple de réalisation de la présente invention, une biotine peut par exemple être

fixée sur la sonde (la sonde porte une biotine), et la cible peut être marquée par de la streptavidine-phycocyanine.

5 Selon l'invention, l'accrochage de la cible « B » par la sonde « A » peut être précédé d'une activation électrochimique de la sonde, par application d'un (de) potentiel(s) ou d'un (de) courant(s) électrochimique(s), à l'électrode de travail. Cette
10 activation permet d'effectuer une variation locale du pH (acidification ou basification), limitée au voisinage de l'électrode de travail (électrode active) et de la zone d'accrochage. L'application de potentiel(s) ou de courant(s) électrochimique(s)
15 adapté(s) provoque une réaction électrochimique dont les produits entraînent par exemple une hydroxylation ou une protonation instantanée et localisée de la solution en contact avec le microsystème, et ainsi, la formation de la liaison entre la sonde et la cible, et
20 l'accrochage de cette dernière par la sonde sur la zone d'accrochage. Par exemple, les groupements électrophiles et les groupements nucléophiles de la sonde et de la cible interagissent et s'accrochent suivant $A + B \rightarrow A-B$.

25 L'activation électrochimique peut être réalisée dans la (les) solution(s) servant à l'assemblage, par exemple « A » + « B-C » ou « A » + « B » + « C » ou « A-B » + « C », donc ne nécessite pas de rinçage du système, ou dans toute autre solution « post-
30 assemblage » si celle-ci est au moins en partie aqueuse, de préférence saline, et de préférence encore

tamponnée, pourvu que les liaisons en jeu ne soient pas empêchées dans la mise en œuvre du procédé de l'invention.

Le processus de décrochage par voie
5 électrochimique de la cible B, ou B-C si un objet « C » est accroché à la cible, implique d'une part un accrochage réversible entre la sonde « A » et la cible « B » par pont d'accrochage comportant des groupements sensibles au pH comme décrit ci-dessus, et d'autre
10 part, une coupure de ce pont réalisée localement (à l'endroit à décrocher), suite à une variation locale et réversible du pH. Ce processus de décrochage est représenté schématiquement sur la figure 2.

L'application de potentiel(s) ou de courant(s)
15 électrochimique(s) adapté(s) provoque une réaction électrochimique dont les produits entraînent par exemple une hydroxylation ou une protonation instantanée et localisée de la solution en contact avec le microsystème, et ainsi, la rupture de la liaison
20 entre la sonde et la cible. Lors de l'étape de décrochage, sous l'influence de la variation de pH électrochimique, les groupements sensibles à cette variation (par exemple liaisons hydrogène, peptidique, amide, sulfonamide, ester d'acide carboxylique, ester
25 d'acide sulfonique, silanoate substitué) se séparent suivant $A-B \rightarrow A + B$. Cette coupure, réversible et localisée, du pont d'accrochage peut également provoquer le détachement de l'objet « C », s'il est présent, qui retourne alors en solution sous la forme
30 B-C ou B + C. Le détachement de C dépend bien entendu de la nature chimique de la liaison qui le lie à B.

L'application d'un (de) potentiel(s) ou d'un (de) courant(s) électrochimique(s) adapté(s) provoque une réaction électrochimique dont les produits entraînent une hydroxylation ou une protonation 5 instantanée et localisée de la solution en contact avec la zone d'accrochage, par exemple du microsystème (solution d'assemblage ou post-assemblage) qui suivant les groupements en cause dans la liaison sonde-cible entraîne le décrochage de la cible par la sonde.

10 Aucun autre phénomène électro-généré, tel que le champ électrique, n'intervient lors de la modulation de surface (c'est-à-dire état accroché ou décroché) par voie électrochimique. C'est un des nombreux avantages de la présente invention.

15 Des accrochages et des décrochages consécutifs sur une même surface, réalisés par les inventeurs, ont montré que les procédés de l'invention sont reproductibles. En effet, les procédés d'accrochage et/ou de décrochage ne sont pas définitifs. Par 20 exemple, grâce à l'existence d'une liaison réversible, telle que celles précitées, dans le pont d'assemblage « A-B », l'accrochage et le décrochage peuvent être répétés et ce, sans altération des propriétés de la surface du microsystème, comme cela est montré dans les 25 exemples ci-dessous. Il s'agit d'un des nombreux avantages de la présente invention.

Dans le dispositif de la présente invention, les électrodes de travail et contre-électrode peuvent être, comme habituellement pour ces éléments, notamment 30 dans les microsystèmes connus de l'homme du métier, constituées d'une matière conductrice, et de préférence

d'un métal noble, ou un alliage de métal noble, par exemple Au, Pt, Pd, Ir ; ou semi-conductrice, par exemple silicium dopé ou carboné, adaptée à l'électrochimie, dans la gamme de potentiels utilisés.

5 Il peut s'agir également d'un polymère conducteur, d'une colle conductrice, de polypyrrole, etc.

Elles peuvent être disposées au voisinage de la zone d'accrochage en utilisant les techniques habituelles de microélectronique permettant de disposer 10 des électrodes sur des microsystèmes telles que des biopuces. Il peut s'agir par exemple de techniques de dépôt sous vide de métaux par exemple par thermo évaporation, par plasma (en anglais : « Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition » (« PECVD »)) ou 15 pulvérisation (en anglais « sputtering »), etc. Des techniques utilisables dans la présente invention sont décrites dans les documents [19] et [20] de la liste de référence annexée.

La zone d'accrochage, notamment si elle 20 requiert un traitement particulier par exemple pour la fixation de la sonde, peut être placée au voisinage des électrodes après leur fabrication. Elle peut également être placée sur la surface du support avant leur fabrication.

25 Les figures 3 et 5 annexées sont des exemples de dispositions des électrodes et de la zone d'accrochage utilisables pour constituer le dispositif de la présente invention. Bien entendu, d'autres dispositions peuvent encore être mises en oeuvre dans 30 le cadre de l'invention à partir des informations fournies dans la présente.

Selon l'invention, de préférence, l'électrode de travail borde ou entoure la zone d'accrochage. De préférence encore, l'électrode de travail borde ou entoure la zone d'accrochage, et la contre électrode 5 borde ou entoure ladite électrode de travail. Selon l'invention, avantageusement, l'électrode de travail, la contre électrode et la zone d'accrochage sont dans une configuration (« design » en anglais) choisie parmi une configuration de peigne inter-digité, une 10 configuration spirale ou une configuration concentrique (voir par exemple figures 3 et 5 annexées). En effet, ces configurations sont favorables à l'application des procédés de l'invention.

La zone d'accrochage et/ou de décrochage est 15 préférablement située au plus près de l'électrode servant à l'activation électrochimique (électrode de travail) et de préférence coplanaire à celle-ci pour assurer une meilleure action électrochimique.

Les schémas des figures 1 et 2 ont été dessinés 20 avec une structure non coplanaire pour mieux distinguer les différents éléments du dispositif représenté. Sur la figure 3, les éléments sont coplanaires. Le positionnement de la contre-électrode peut être ou ne pas être coplanaire à la zone d'accrochage et/ou de 25 décrochage.

Une électrode de référence (RE) peut également être jointe au dispositif, placée de manière à pouvoir mesurer le potentiel appliqué à l'électrode de travail. Pour des raisons de miniaturisation, l'électrode de 30 référence peut être intégrée au microsystème. Il peut s'agir par exemple d'une électrode Ag/AgCl ou de toute

autre électrode de référence connue de l'homme du métier et utilisable dans le dispositif de la présente invention. Sur les figures 3 et 5 annexées, sont représentées des dispositions possibles de l'électrode 5 de référence sur des dispositifs conformes à la présente invention.

A titre d'exemple, les dimensions, dans le plan de la représentation sur ces figures, des électrodes et composants utilisés pour obtenir les dispositifs de 10 l'invention peuvent être les suivantes pour un microsystème destiné à une application biopuce :

- zone d'accrochage (Z) : diamètre 1 à 1000µm ;
- espace entre la zone d'accrochage (Z) et l'électrode de travail (WE), et entre 15 l'électrode de travail et la contre électrode (CE) : espace de 10 à 200µm ;
- largeur des électrodes de travail (Z) et contre électrode (CE) : 10 à 50µm ; et
- l'électrode de référence (RE) est un 20 parallélépipède de 10 x 500 µm.

Ces dimensions ne sont en fait limitées que par les limites des dimensions qui peuvent être atteintes en microélectroniques par les techniques actuelles.

25 L'homme du métier peut bien entendu aisément fabriquer des dispositifs avec d'autres dimensions sur la base des informations données dans la présente et de ses connaissances générales.

Les moyens permettant d'appliquer un courant 30 électrique ou un potentiel déterminé à l'électrode de travail sont ceux habituellement utilisés pour les

microsystèmes en particulier pour des cellules électrochimiques. Ils peuvent comprendre des moyens de connexion des électrodes du dispositif à la source d'électricité permettant d'appliquer le courant électrique à l'électrode de travail. Ils peuvent comprendre en outre des moyens de commande et des moyens de mesure afin de pouvoir régler et suivre le potentiel appliqué à l'électrode de travail.

Le(s) potentiel(s) électrochimique(s) à appliquer à l'électrode de travail pour réaliser l'accrochage et/ou le décrochage dépend(ent) du type de pont d'assemblage entre la sonde et la cible (« A-B »), de la solution aqueuse électrolyte au contact du microsystème (solution de travail), de la configuration et du matériau des électrodes utilisées.

Selon l'invention, le courant peut être appliqué à l'électrode de travail de manière continue ou discontinue, croissante ou décroissante, etc. Cette application dépend notamment de la variation de pH locale que l'utilisateur désire induire. Selon l'invention, ce(s) potentiel(s) ou ce(s) courant(s) peut (peuvent) être cathodique(s), anodique(s) ou les deux.

Le courant électrique peut avantageusement être appliqué sous forme de trains de potentiels. En effet, les inventeurs ont mis en évidence qu'un train de potentiels permet avantageusement de mieux localiser la variation de pH mais aussi de la rendre réversible. Dans ce cas, les moyens permettant d'appliquer un courant électrique ou un potentiel déterminé à ladite électrode de travail comprennent avantageusement des

moyens permettant d'appliquer un ou des train(s) de courant ou de potentiel(s) déterminé(s) pendant une ou des durée(s) déterminée(s).

5 Ce train de potentiels ou de courants est de préférence composé au minimum d'un signal (pulse, rampe de potentiels, etc.). Le train de potentiels, ou de courants électrochimiques, appliqué peut par exemple être choisi de sorte à provoquer une variation du pH et à compenser celle-ci immédiatement, sans qu'une
10 modification du reste de l'environnement n'ait lieu.

De manière générale, les valeurs du (des) potentiel(s) électrochimique(s) utilisées dépendent de la variation locale de pH désirée, et donc de la nature de la liaison sonde-cible en cause. En général, compte
15 tenu du type de liaisons sonde-cible réversibles visée dans la présente invention, les valeurs de potentiels sont de préférence, sans y être limité, de -3,0 V à +4,0 V (par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl) et de préférence de -1,8 V à -0,8 V ou entre
20 +1,2 à +2,2 V (par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl). Les valeurs des courants utilisés sont celles permettant d'obtenir les fenêtres de potentiels précédentes par potentiométrie.

Le potentiel ou le train de potentiels ou de courants, suivant le choix d'application du courant, est de préférence imposé pendant une durée suffisante, allant par exemple de 0,001 s à 58000 s, ou de 0,001s à 20000 s, afin de produire la variation de pH permettant l'accrochage de la cible ou son décrochage suivant le
30 procédé appliqué.

Chaque élément du train de potentiels ou de courants possède une durée, une valeur et une forme qui lui sont spécifiques, et qui sont indépendantes des autres éléments du train de potentiels.

5 Pour la mise en œuvre des procédés de l'invention, la zone d'accrochage fonctionnalisée et les électrodes sont immersés par l'échantillon aqueux. Le volume d'échantillon n'est pas déterminant car la variation de pH est précisément localisée au niveau de
10 la zone d'accrochage. Cet échantillon est obtenu en mélangeant un prélèvement (comme défini ci-dessus), ou tout simplement la cible, avec une solution aqueuse. Les solutions aqueuses tamponnées sont préférées pour la préparation de l'échantillon, mais non
15 indispensables à la réalisation des procédés de l'invention. En effet, l'eau suffit à l'activation électrochimique.

Le tampon permet avantageusement de limiter la diffusion des produits de la réaction électrochimique
20 (OH^- ou H^+) dans le reste de la solution et améliore le flux de ces produits au voisinage de l'électrode de travail et de la zone d'accrochage/décrochage. Il permet une meilleure localisation de la variation de pH, favorisant la localisation des phénomènes
25 d'accrochage et de décrochage au niveau de la zone d'accrochage et de l'électrode de travail. Cette solution aqueuse peut être par exemple une solution de tampon phosphate, telle qu'une solution de Na_2HPO_4 , de NaH_2PO_4 , de KH_2PO_4 , etc. ou d'un mélange de ces tampons.
30 Les concentrations sont en général comprises entre 0,001 mM et 10 M, de préférence entre 1 mM et 1M.

De préférence la solution aqueuse est une solution saline. En effet, ce type de solution améliore la conduction électrique, et, par exemple dans le cas des molécules biologiques (par exemple les protéines en 5 général) elle permet de maintenir les molécules biologiques dans leur forme active (repliement des protéines) et/ou permet la liaison sonde/cible, pour la mise en œuvre du procédé de l'invention. Dans le cas où la sonde et/ou la cible sont des molécules biologique, 10 la solution saline permet de mettre en œuvre le procédé de l'invention dans une solution aqueuse de force ionique appropriée.

De préférence encore, cette solution est saline et tamponnée.

15 De manière générale, le choix de cette solution peut se faire notamment en fonction de la nature de la sonde et de la cible, en particulier cette solution devrait préserver les fonctions chimiques et la structure de la sonde et de la cible et permettre aussi 20 à la sonde d'accrocher la cible. En outre elle facilite la mise en œuvre du procédé électrochimique de la présente invention en constituant un milieu électrolyte adéquat.

Selon l'invention, la localisation de 25 l'accrochage et/ou du décrochage de la cible peut donc être contrôlée notamment par le choix :

- du dispositif électrochimique : les dispositions particulières des électrodes à la surface du microsystème permettent la localisation de la 30 variation de pH ;

- d'appliquer un courant ou un potentiel au choix à une ou à plusieurs cellule(s) déterminée(s) seulement, dans le cas d'une matrice ou d'un ensemble de microcellules électrochimiques selon l'invention 5 réparties sur la surface d'un support : dans ce cas aussi, la variation de pH est localisée là où l'opérateur le désire ;

- de la solution au contact du microsystème : l'utilisation de solutions tamponnées salines est 10 préférable ; et

- d'un procédé électrochimique approprié : par exemple, les inventeurs ont noté que l'application de trains de potentiels électrochimiques permet de mieux contrôler de la variation de pH.

15 La présente invention trouve de très nombreuses applications, et quelques exemples seulement sont cités ici.

La présente invention peut s'appliquer notamment à des procédés de séparation et de 20 récupération d'objets biologiques et/ou chimiques : par exemple un tri cellulaire par accrochage sélectif, par exemple via un anticorps spécifique à ce type de cellule, à la surface du microsystème puis décrochage dans une autre solution et/ou vers une autre partie du 25 microsystème pour la réalisation d'autres tâches telles qu'une analyse, une détection, etc.

La présente invention peut s'appliquer aussi à des fonctions de concentration d'objets biologiques et/ou chimiques : par exemple, accrochage des objets 30 présents dans une solution circulant au-dessus de la surface d'accrochage puis décrochage dans une autre

solution de volume inférieur pour faciliter la réalisation d'autres tâches telles qu'une analyse, une détection, etc.

La présente invention peut s'appliquer aussi à
5 la réalisation de réactions biologiques et/ou chimiques nécessitant une temporisation par exemple : déprotection chimique, criblage de molécules d'intérêt pharmacologique, etc.

La présente invention peut s'appliquer aussi
10 à des études fondamentales portant sur les propriétés physico-chimiques, thermiques, physiques, surfaciques, chimiques, ou sur le changement de fonctionnalité des objets, avant, pendant et après accrochage, par exemple : étude énergétique des mécanismes de la
15 fixation cellulaire.

Ainsi, le dispositif de l'invention peut être utilisé par exemple dans un procédé destiné à purifier ou extraire une cible « B » ou un objet « C » fixé sur une cible « B-C » ; à concentrer une cible « B » ou un
20 objet « C » fixé sur une cible « B-C » ; à cribler des cibles ou des objets fixés sur une cible ou à détecter une cible « B » ou un objet fixé sur une cible « B-C ». La cible « B » et l'objet « C » ont été définis ci-dessus.

25 La présente invention trouve par exemple aussi une application dans un procédé de purification d'une cible « B » ou d'un objet « C », ledit procédé de purification comprenant par exemple la mise en oeuvre du procédé d'accrochage « actif » ou « passif » selon
30 l'invention, avec ladite cible « B » ou ledit objet « C » lié à une cible (ledit objet étant lié à ladite

cible avant ou après l'accrochage de la cible par la sonde) (« B-C ») en utilisant un dispositif approprié selon l'invention ; un rinçage de ladite zone d'accrochage au moyen de ladite solution aqueuse ou 5 d'une autre solution préservant la liaison sonde-cible (« A-B ») ou sonde-cible-objet (« A-B-C »); le décrochage de l'objet « B » ou cible-objet (« B-C ») soit en interrompant l'application du courant électrique à l'électrode de travail, soit en appliquant 10 un courant électrique ou un potentiel différent au niveau de ladite zone d'accrochage de façon à modifier localement le pH de la solution de travail afin que la cible ou cible-objet se décroche de la sonde, soit en rinçant le dispositif au moyen d'une solution 15 appropriée pour décrocher la cible ; et éventuellement le rinçage de la zone d'accrochage de manière à récupérer la cible ou cible-objet décrochée. La cible « B » et l'objet « C » ont été définis ci-dessus.

20 Ce procédé permet également de concentrer une cible « B » ou un objet lié à une cible « B-C », par exemple en utilisant dans le procédé de purification précité un volume de rinçage de la cible ou de la cible-objet décrochée plus petit que le volume initial de l'échantillon. La cible « B » et l'objet « C » ont 25 été définis ci-dessus.

La présente invention trouve donc de très nombreuses applications pour la fabrication de nouvelles générations de biopuces, ou laboratoire sur 30 puce (« lab-on-chip » en anglais). Il s'agit par exemple de microsystèmes comportant diverses étapes de

travail, réalisées dans un ou plusieurs compartiments, et ce de façon consécutive. Les fonctions d'accrochage ou de décrochage peuvent utilisées comme une partie d'une ou plusieurs de ces étapes, ou comme une étape à 5 part entière. L'accrochage et/ou le décrochage pourraient permettre de réaliser divers types de fonctions, telles que :

- des fonctions de séparation et de récupération d'objets biologiques et/ou chimiques : on 10 peut imaginer un tri cellulaire par accrochage sélectif, par exemple via un anticorps spécifique à ce type de cellule, à la surface du microsystème puis décrochage dans une autre solution et/ou vers une autre partie du microsystème pour la réalisation d'autres 15 tâches (analyse, détection, etc.) ;

- des fonctions de concentration d'objets biologiques et/ou chimiques : par exemple, accrochage des objets présents dans une solution circulant au dessus de la surface d'accrochage puis décrochage dans 20 une autre solution de volume inférieur pour faciliter la réalisation d'autres tâches, par exemple d'analyse, de détection, etc. ;

- la réalisation de réactions biologiques et/ou chimiques nécessitant une temporisation, par 25 exemple pour un criblage de molécules d'intérêt pharmacologique, une déprotection chimique, etc. ;

- des études fondamentales portant sur les propriétés physico-chimiques, thermiques, physiques, surfaciques, chimiques, ou sur le changement de 30 fonctionnalité des objets, avant, pendant et après

accrochage, par exemple des études énergétiques des mécanismes de la fixation cellulaire.

D'autres caractéristiques, avantages, et
5 applications potentielles apparaîtront encore à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre d'illustration en référence aux figures annexées.

Brève description des figures

- La figure 1 représente schématiquement une
10 stratégie d'accrochage d'élément(s) biologique(s) et/ou chimique(s) par voie électrochimique selon le procédé de l'invention : à gauche : les différents éléments sont mis en présence (sonde « A », cible « B » et objet « C ») ; au centre : activation par voie
15 électrochimique et variation locale du pH (indiquée par la flèche et les petits signes positifs) favorisant l'assemblage ; à droite : l'objet « C » est accroché par l'intermédiaire de la cible sur la sonde.

- La figure 2 représente schématiquement une
20 stratégie de décrochage d'élément(s) biologique(s) et/ou chimique(s) par voie électrochimique selon le procédé de l'invention : à gauche : assemblage de la cible « B » et de l'objet « C » sur la sonde « A » ; au centre : activation par voie électrochimique au moyen
25 de l'électrode de travail « WE » et variation locale du pH (indiquée par la flèche et les petits éclairs) pour le décrochage ; à droite : l'objet « C » est décroché avec « B » (« B-C »).

- La figure 3 représente schématiquement deux
30 exemples de configuration de dispositif à trois ou

quatre électrodes (respectivement à gauche et à droite).

- La figure 4 représente trois photographies d'une zone d'accrochage et de décrochage sur laquelle 5 des objets fluorescents ont été accrochés selon le procédé de la présente invention : immédiatement après accrochage (photo de gauche), après décrochage électrochimique (photo du milieu) et après un nouvel accrochage (photo de droite).

10 - La figure 5 représente schématiquement des exemples de configurations de dispositifs conformes à la présente invention comprenant : une zone d'accrochage (Z), une électrode de travail (WE), une contre-électrode (CE) et une électrode de référence 15 (RE) respectivement de gauche à droite : sous forme inter-digitée, spirale et concentrique, constituant des microcellules électrochimiques adaptées à l'accrochage au décrochage d'objets selon l'invention. Noir = zone d'accrochage et/ou de décrochage, gris foncé = électrode de travail, gris clair = contre 20 électrode, hachuré = électrode de référence.

- La figure 6 représente trois photographies d'une microcellule électrochimique selon la présente invention dans trois états différents : au repos (image 25 de gauche), pendant l'activation électrochimique (image du milieu) et après correction électrochimique de la variation de pH (image de droite). La variation de pH est mise en évidence à l'aide d'un indicateur coloré, ici le rouge de crésol. Ces trois photographies sont 30 mises en relation avec un graphique montrant l'application du potentiel (P) (en V) et du courant (I)

obtenu (en A) à l'électrode de travail en fonction du temps (t) (en s).

- La figure 7 est un graphe représentant la variation de pH (μpH) obtenue par voie électrochimique 5 au voisinage de l'électrode de travail et de la zone d'accrochage/décrochage d'un dispositif selon l'invention en fonction du pH (pH initial) du milieu dans lequel le dispositif est immergé (solution tampon).

10

EXEMPLES

Exemple 1 : fabrication d'un dispositif selon l'invention

15 Dans cet exemple, le dispositif de l'invention est fabriqué sur un support de silice suivant le protocole exposé dans le document [15] dans la liste de référence annexée. La fabrication du dispositif comprend les étapes suivantes :

20 Sur un substrat de silicium :

- oxydation de la surface du substrat sur une épaisseur de 1 μm ;
- dépôt d'une couche de métal (Pt ou Au) sur une couche d'accrochage de Ti par une technique par 25 évaporation ;
- structuration des électrodes par photolithographie et gravure sèche ;
- passivation des pistes par dépôt d'oxyde de silicium suivi d'une ouverture (photo puis 30 gravure de l'oxyde) des électrodes de mesure ;

- dépôt électrochimique d'argent sur les électrodes de références ; et
- étude de la chloration chimique des électrodes.

5 Les dispositifs fabriqués sont ensuite connectés à un potentiostat (AutoLab PGstat 100 de la société Ecochemie) afin de pouvoir mesurer et contrôler le potentiel et/ou le courant appliqué. La configuration utilisée est une configuration classique
10 pour des cellules électrochimiques, c'est-à-dire une configuration à trois électrodes : une électrode de travail, une contre-électrode, et une électrode de référence, cette dernière étant optionnelle.

15 **Exemple 2 : exemple de configurations de dispositifs selon l'invention (microcellules électrochimiques)**

Différents microsystèmes électrochimiques dont la configuration est adaptée à l'accrochage et au décrochage par voie électrochimique selon l'invention
20 ont été réalisés suivant le protocole de l'exemple 1.

Ces dispositifs sont représentés schématiquement sur la figure 5 annexée. Sur cette figure, « CE », « WE », « Z » et « RE » représentent respectivement la contre électrode, l'électrode de travail, la zone d'accrochage et/ou de décrochage, et l'électrode de référence.

Les dimensions, dans le plan de la représentation, des électrodes et composants utilisés pour les dispositifs fabriqués dans cet exemple sont
30 données en exemple pour le dispositif représenté sur le

troisième schéma de la figure 5 en commençant par la gauche :

- zone d'accrochage (Z) : diamètre 300µm ;
- espace entre la zone d'accrochage (Z) et l'électrode de travail (WE), et entre l'électrode de travail et la contre électrode (CE) : espace constant d'environ 70µm ;
- largeur des électrodes de travail (WE) et contre électrode (CE) : 130µm ; et
- l'électrode de référence (RE) est un parallélépipède de 50 x 200 µm.

Les autres dispositifs sur cette figure sont représentés sensiblement à la même échelle.

15

Exemple 3 : préparation de la zone d'accrochage et fonctionnalisation de cette zone par la sonde

Différentes préparations de différentes zones ont été réalisées dans cet exemple dans différents essais, par différentes techniques :

20
25
A) Préparation d'une zone d'accrochage par électrogreffage de polymères conducteurs et fonctionnalisation par des oligonucléotides

Dans cet exemple, la zone d'accrochage est préparée par électrogreffage d'une couche de polymères constituée de pyrrole et d'oligonucléotides-pyrrole, selon les conditions et le protocole décrit dans le document référencé [18].

L'électrocopolymérisation du polymère des deux monomères entraîne l'immobilisation du brin oligonucléotide (la sonde) par sa terminaison pyrrole.

5 B) Préparation d'une zone d'accrochage par silanisation et immobilisation de diverses fonctions chimiques

Les protocoles suivants sont donnés pour un greffage de silane portant différentes fonctions. Dans ces protocoles, la sonde est la fonction portée par le
10 silane.

(i) Fonction époxyde

On utilise le protocole de silanisation décrit dans la demande WO-A-02/051856 :

15 - réhydratation de la surface du microsystème (formation de fonctions silanol, SiOH) dans une solution contenant 7g NaOH + 21 ml d'eau distillée + 28ml éthanol pendant 2 heures sous agitation à température ambiante ;

20 - lavages abondants à l'eau désionisée ;
- séchage à 80°C pendant 15 minutes ;
- réaction dans un mélange toluène 30ml + triéthylamine 0,9ml + 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane 36µl pendant 16 heures à 80°C ;
- rinçage à l'acétone; et
25 - réticulation 3 heures à 110°C.

(ii) Fonction aldéhyde

On utilise le protocole de silanisation décrit dans la demande WO-A-02/051856 :

30 - réhydratation de la surface du microsystème (SiOH) dans une solution contenant 7g NaOH + 21 ml

d'eau distillée + 28ml éthanol pendant 2 heures sous agitation à température ambiante ;

- lavages abondants à l'eau désionisée ;
- séchage à 80°C pendant 15 minutes ;

5 - réaction dans un mélange toluène 30ml + triéthylamine 0,9ml + 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane 36µl pendant 16 heures à 80°C ;

- rinçage à l'acétone ;
- réticulation 3 heures à 110°C ;
- 10 - hydrolyse acide dans HCl 0,2N pendant 3 heures à température ambiante ;
- rinçages à l'eau distillée ; et
- oxydation des fonctions diols de surface en fonctions aldéhydes pendant 1 heure à température 15 ambiante dans une solution de NaIO₄ (660mg de NaIO₄, 30ml eau désionisée).

(iii) Fonction halogénure

On utilise le protocole suivant :

- 20 - réhydratation de la surface du microsystème (SiOH) dans une solution contenant 7g NaOH + 21 ml d'eau distillée + 28ml éthanol pendant 2 heures sous agitation à température ambiante ;
- 25 - lavages abondants à l'eau désionisée ;
- 25 - séchage à 80°C pendant 15 minutes ;
- isopropyléthylamine 0,6ml + ((p-chlorométhyl) phényléthyl) triméthoxysilane 50µl pendant 24 heures à température ambiante ;
- 30 - rinçage à l'éthanol ; et
- réticulation 3 heures à 110°C.

C) Préparation d'une zone d'accrochage par adsorption de polymères, de protéines ou de thiols porteurs de fonctions chimiques

5 Dans tous les cas, il s'agit d'immerger l'électrode ou la surface constituant la zone d'accrochage dans la solution faite du solvant adapté à chaque type de molécule :

- solution aqueuse pour les protéines,
- 10 - éthanol pour les thiols,
- pendant une durée suffisante (à température ambiante) :
- 1 heure pour les protéines,
- 24 heures pour les thiols, sous argon.

15 Les procédés utilisés sont décrits dans les documents référencés [8] à [12] de la liste de référence annexée. Dans tous ces procédés ci-dessus, on peut remplacer l'eau distillée par de l'eau désionisée.

20 Dans ces cas, la sonde est soit une fonction portée par les thiols greffés, soit la protéine ou le polymère immobilisé, par exemple à la surface du microsystème, pour former la zone d'accrochage.

25 **Exemple 4 : exemple d'accrochage « passif » et de décrochage « actif » réversible par voie électrochimique selon la présente invention**

Dans cet exemple, l'accrochage utilisé est le suivant :

30 - La sonde (« A ») est un brin d'oligonucléotide immobilisé par du polypyrrole sur une

zone d'accrochage d'un dispositif selon l'invention réalisé comme dans les exemples 1 et 2 ;

- La cible « B » est un oligonucléotide complémentaire de la sonde « A », et portant une
5 biotine ;

- Une autre molécule, appelée « C », objet à ancrer via la cible sur la zone d'accrochage, est un marqueur : une streptavidine-phycoérythrine (conjugué fluorescent).

10 Le protocole d'accrochage de la sonde est celui décrit dans le document référencé [18]. Les oligonucléotides ont été modifiés pour qu'ils comportent un groupement pyrrole. Ces oligonucléotides modifiés sont ensuite immobilisés par électrogreffage
15 sur la zone d'accrochage.

Les cibles complémentaires biotinylées ($0,1\mu M$) ont été hybridées 15 minutes à $50^\circ C$ et l'objet (streptavidine phycoérythrine, solution commerciale diluée 10 fois) a ensuite été immobilisé sur la zone
20 d'accrochage par affinité chimique entre la biotine et la streptavidine pendant 5 minutes à température ambiante.

Des étapes de rinçage sont effectuées avec un tampon phosphate salin ($NaCl = 27mM$, $KCl = 138mM$)
25 + 0,3% de tween.

La présence de fluorescence est caractéristique de l'état accroché de l'objet « C ». Cette fluorescence est observée sous microscope de fluorescence (Provis (marque de commerce)).

30 Pour l'activation électrochimique : le microsystème est connecté à un potentiostat (AutoLab

PGstat100, de la société Ecochemie) et par chronoampérométrie : un potentiel de $V = -1,2V$, par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, est appliqué à l'électrode de travail du microsystème 5 pendant 2 secondes.

L'état ancré de la cible par la sonde est confirmé par observation du signal de fluorescence comme cela apparaît sur la figure 4 annexée, image de gauche. L'état décroché est vérifié lorsque le signal 10 de fluorescence disparaît comme cela est visible sur la figure 4 annexée, image centrale.

Ce processus électrochimique n'affecte pas la réversibilité de l'accrochage, car un nouvel accrochage 15 d'objets fluorescents a été effectué dans les mêmes conditions et s'est accompagné de l'observation d'un nouveau signal de fluorescence visible sur la figure 4, image de droite.

Des accrochages et des décrochages successifs sur une même zone d'accrochage et de décrochage ont en 20 outre montré que le processus peut être répété sans altération de la fonctionnalité « A » de cette zone d'accrochage et de décrochage.

Exemple 5 : exemple de train de potentiels 25 électrochimiques permettant de gérer et de localiser la variation électro-commandée du pH dans le procédé de l'invention

Le choix de la configuration des électrodes, de la solution support mais aussi le choix d'un train de 30 potentiels adapté, permet de contrôler la localisation du processus de décrochage.

Par exemple, des tests colorimétriques et électrochimiques réalisés à l'aide de microélectrodes concentriques comme celles fabriquées dans l'exemple 2, ont mis en évidence la possibilité de localiser de manière précise au voisinage de l'électrode de travail (électrode active) le phénomène de variation électrochimique du pH.

Par exemple, une goutte de solution aqueuse contenant un indicateur coloré par exemple choisi parmi le Bleu de Bromocrésol, le Vert de Bromocrésol, le Bleu de Thymol, la Phénolphtaléine et le Rouge de Chlorophénol, le Rouge de Crésol ou le Tropéoline O, vire seulement au-dessus de l'électrode active et de la zone d'accrochage et/ou de décrochage et disparaît rapidement lorsque la suite du train de potentiels électrochimiques est appliquée comme cela est visible sur la figure 6 annexée. Le virage des indicateurs précités se situe entre 0,2 et 13 unité pH.

Mode opératoire : dans différents essais, des microcellules électrochimiques fabriquées comme dans les exemples 1 et 2 ont été recouvertes de solutions tamponnées de phosphates (KH_2PO_4 et Na_2HPO_4) de différents pH : 4,6 ; 5,1 ; 6,0 ; 7,0 ; 7,4 ; 8,0 et 9 ; et contenant quelques % de divers indicateurs colorés : Phénolphtaléine, Rouge de Crésol, Bleu de Thymol, Bleu de Bromothymol, Vert de Bromocrésol, Jaune de Méthyle et Rouge de Chlorophénol ; dont les zones sont comprises entre pH 0,2 et 10.

Ces microsystèmes sont ensuite connectés à un potentiostat et des potentiels de -0,8V à -1,4V et de +0,8V à +2,0V sont appliqués pendant 2 à 10s.

Les variations de couleurs sont observées sous 5 lumière blanche à l'aide d'un banc optique composé d'une binoculaire, d'une caméra CDD couleur et d'un système d'acquisition d'images.

Les variations de pH obtenue sur l'électrode de travail (WE) et la zone d'accrochage (Z) vont jusqu'à 10 +/- 3 unités de pH comme cela est représenté sur le graphique de la figure 7 annexée.

L'application de ce train de potentiels permet une compensation immédiate de la variation de pH.

Des photographies de la localisation de la 15 variation de pH mise en évidence par un indicateur coloré, ici le rouge de Crésol, ont été réalisées. Elles mettent en évidence la variation locale du pH par voie électrochimique, sur une microcellule concentrique.

20 La variation est bien confinée au dessus de l'électrode de travail et de la zone fonctionnalisée centrale (surface d'accrochage et de décrochage) conformément à l'attente des inventeurs, et grâce à la mise en œuvre de la présente invention..

25 La figure 6 annexée est une représentation de train de potentiels à 3 pulses et de photographies correspondantes du dispositif de l'invention (avant et après chaque pulse).

Sur cette figure, Graphe I = f(t) (I en A et 30 t, le temps, en s) : courant obtenu suite à

l'application d'un train de potentiels électrochimique permettant la variation de pH et sa compensation.

Ces images illustrent la compensation de la variation de pH d'une goutte de solution tamponnée (PBS pH = 7,4) + rouge de Crésol. La couleur rouge est indicative d'un pH supérieur à 8,8. Le potentiel (en V) est également indiqué.

**Exemple 6 : exemple d'accrochage par voie
10 électrochimique**

Suivant le procédé de silanisation décrit dans la demande de brevet WO-A-02/051856, des fonctions époxydes sont greffées à la surface de microsystèmes selon l'invention pour former des zones d'accrochage.

15 Ces dernières sont ensuite mises en présence d'une solution de tampon phosphate + 10% de glycérol contenant des oligonucléotides (ODN) porteurs d'une fonction amine terminale en 5' (ODN-NH₂). Cette solution forme la solution de travail au sens de la
20 présente invention.

Pour l'accrochage de ODN-NH₂ sur la zone d'accrochage : La réaction entre les fonctions époxyde et amine est activée par hydroxylation électrochimique suivant le procédé de l'invention : application d'un
25 potentiel de -1,2V, par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, pendant 1200s à l'électrode de travail.

30 Ce protocole entraîne une réaction entre la fonction amine de l'ODN-NH₂ et les fonctions époxyde de la zone d'accrochage. Les oligonucléotides sont alors accrochés à la zone d'accrochage. La détection de cet

accrochage est faite par mesure de fluorescence : un ODN cible marqué d'un fluorophore (streptavidine-CY3) est hybridé et le microsystème est observé à l'aide d'un microscope de fluorescence.

5 L'accrochage des oligonucléotides par voie électrochimique a été observé en image en lumière blanche et sous lumière fluorescente.

10 **Exemple 7 : Décrochage de cellules immobilisées à la surface d'un microsystème**

Une matrice protéique a été greffée par adsorption pendant 1 heure à température ambiante sur des dispositifs selon l'invention pour former des zones d'accrochage selon l'invention. Ces dernières ont été 15 immergées dans un milieu de culture cellulaire contenant des cellules HE LA (environ $2,76 \cdot 10^6$ c/ml).

Après 2 heures d'incubation, quelques cellules présentaient une forme étalée, caractéristique de leur immobilisation sur une surface.

20 Un décrochage électrochimique suivant le procédé de l'invention a été réalisé dans une goutte de PBS (pH = 7,4 [NaCl] = 2,7 mM et [KCl] = 138 mM) en modulation de pH pour protéger les cellules. L'activation électrochimique est similaire à celle 25 présentée à l'exemple 5.

On constate que leur forme devient arrondie, ce qui signifie qu'elle se détache progressivement de la surface à laquelle celles-ci adhéraient.

Ces résultats expérimentaux confirment 30 l'utilisation de la présente invention pour l'accrochage et/ou le décrochage d'objets biologiques

sur un microsystème électrochimique selon la présente invention.

**Exemple 8 : exemple d'accrochage et décrochage d'une
5 biotine par voie électrochimique**

Suivant le procédé de fonctionnalisation par silanisation décrit dans l'exemple 3 B)(ii), des fonctions aldéhydes sont accrochées à la surface et sont ensuite mises en présence d'une solution de tampon 10 phosphate salin (« PBS » pH = 7,4, NaCl = 27mM, KCl = 138mM) contenant des biotine-amine ([20mM]) (molécule disponible chez Molecular Probes).

La réaction entre les fonctions aldéhyde et amine est activée par hydroxylation électrochimique (- 15 1,2V, par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, pendant 7200s, AutoLab PGstat100, Ecochemie) dans une chambre humide et entraîne la création d'une liaison imine. L'ensemble biotine-amine est alors accroché à la surface.

20 Pour vérifier l'accrochage, un fluorophore (streptavidine-phycoérythrine) est couplé à la biotine (mise en présence pendant 5 minutes puis rinçage avec une solution PBS). La détection de l'état accroché est faite à l'aide d'un microscope de fluorescence.

25 Le clivage de la fonction imine est ensuite réalisé par protonation électrochimique locale de la solution en contact avec le microsystème. Un potentiel de +1,6V par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl est appliqué (AutoLab PGstat100, Ecochemie) 30 pendant 7200s et, après rinçage avec une solution

tampon, le microsystème est observé sous un microscope de fluorescence.

La disparition du signal est indicatrice du décrochage.

5 Une autre réaction d'accrochage est effectuée qui vérifie la complète réversibilité et prouve que la disparition du signal est seulement due au décrochage de la cible, c'est-à-dire de la biotine.

10 **Exemple 9 : exemple d'accrochage et décrochage d'une cible par voie électrochimique**

Dans cet exemple, on prépare une zone d'accrochage capable d'accrocher une cible « B » capable de « porter » un objet « C ».

15 La zone d'accrochage est fonctionnalisée par une fonction aldéhyde (sonde « A »), la cible « B » est le dihydrochlorure 2-hydrazinopyridine porteur d'une fonction hydrazine.

20 Suivant le procédé de fonctionnalisation par silanisation décrit dans l'exemple 3 B)(ii), des fonctions aldéhyde sont accrochées à la surface et sont ensuite mises en présence d'une solution de tampon phosphate contenant un dihydrochlorure 2-hydrazinopyridine porteur d'une fonction hydrazine ([25mg/ml]).

25 La formation d'une liaison hydrazone, entre les fonctions aldéhyde et hydrazine, est permise (déprotection de hydrochlorure d'hydrazine en milieu alcalin) par hydroxylation électrochimique (-1,2V, par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, pendant

58000s, AutoLab PGstat100, Ecochemie) dans une chambre humide.

L'accrochage est vérifié par Infrarouge multi-réflexions, où un pic caractéristique du groupement 5 pyridine est détecté.

Le clivage de la fonction hydrazone est ensuite catalysé par protonation électrochimique locale de la solution en contact avec le microsystème Un potentiel de +1,6V, par rapport à une électrode de référence 10 Ag/AgCl, est appliqué (AutoLab PGstat100, Ecochemie) pendant 22000s et, après rinçage avec une solution tampon, le microsystème est observé.

La disparition du pic est indicatrice du décrochage.

15

Exemple 10 : exemple d'accrochage et décrochage d'un objet par voie électrochimique

On utilise la zone de fonctionnalisation et la cible de l'exemple 9.

20 Sur la cible comportant une fonction ester activée et une fonction hydrazine protégée (par exemple hydrochlorure succinimidyl hydraziniumnicotinate), on greffe une protéine (objet « C »), puis la fonction hydrazine est déprotégée afin de pouvoir être 25 accrochée.

L'ensemble cible-objet est « accrochable » et « décrochable » sur la zone de fonctionnalisation par la cible qui sert ici d'intermédiaire (« linker » en anglais) suivant le procédé de la présente invention.

30

Exemple 11 : exemple d'accrochage et décrochage d'un anticorps

Cet exemple montre une mise en œuvre de la présente invention avec une molécule biologique.

5 Le protocole d'accrochage de la sonde est celui décrit dans le document référencé [18]. Il s'agit d'immobiliser par électrogreffage des oligonucléotides modifiés (comportant un groupement pyrrole). Les cibles complémentaires biotinylées (0,1 μ M) sont hybridées 15
10 minutes à 50°C.

Un empilement protéique (avidine / protéine A biotinylée/ anticorps) est alors réalisé. Les différentes étapes de l'empilement sont réalisées, soit in-situ, soit en solution (PBS) et l'empilement peut 15 être réalisé élément par élément ou en mélange global. Dans tous les cas, chaque étape s'effectue par mise en présence des éléments pendant 1 heure et 30 minutes sous agitation et à température ambiante. Les concentrations utilisées sont de 1mg/ml en Avidine et 20 protéine A et de 20mg/ml d'anticorps (AC anti E. Coli). Les étapes de rinçage sont effectuées avec un tampon phosphate salin (PBS pH = 7,4, NaCl = 27mM, KCl = 138mM) + 0,3% de tween. Pour vérifier l'accrochage, un 25 anticorps marqué à la fluorescéine est utilisé. L'observation sous microscope d'un signal de fluorescence est caractéristique de l'état accroché de l'objet.

Décrochage électrochimique : le microsystème est connecté à un potentiostat (AutoLab PGstat100, 30 Ecochemie) et par chrono-ampérométrie un potentiel de v

= -1,2V, par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, est appliqué au microsystème pendant 4 s.

Après rinçage avec une solution PBS + 0,3% de tween, le microsystème est observé sous un microscope 5 de fluorescence. La disparition du signal est indicatrice du décrochage.

Une autre réaction d'accrochage effectuée vérifie la complète réversibilité prouve que la disparition du signal est uniquement due au décrochage 10 de la cible, c'est-à-dire de l'anticorps et le reste de l'empilement protéique.

Exemple 12 : exemple d'accrochage d'un ferrocène

Cet exemple montre une mise en œuvre de la 15 présente invention avec une molécule chimique.

La fonctionnalisation est réalisée par greffage d'un thiol acide : immersion de la surface du microsystème dans une solution de 1mM d'acide 11-mercapto-undecanoïque dans de l'éthanol pendant 24 20 heures sous Argon, rinçage dans un bain à ultrasons dans de l'éthanol pendant 10 minutes. Puis une fonction ester activée est synthétisée par réaction entre la fonction acide et le N-hydroxysuccinimide. L'acide est mis en présence de N-hydroxysuccinimide (4mM) + du 25 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (4mM) dans du chloroforme pendant 2 heures à température ambiante, suivant le protocole de la référence [21].

La surface du microsystème présente alors des fonctions ester activées. Ces dernières sont ensuite 30 mises en présence d'une solution de tampon phosphate (pH 7,4) contenant des ferrocènes-amine ([20mM],

synthétisés selon le protocole décrit dans la référence [22].

Une activation électrochimique catalyse la formation d'une liaison amide. L'accrochage par 5 hydroxylation a lieu dans les conditions suivantes : - 1,4V par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl pendant 22000s (AutoLab PGstat100, Ecochemie). Les ferrocènes sont alors accrochés à la surface. La détection est faite par électrochimie (voltamétrie 10 cyclique, balayage de 0V à 0,5V par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, à 50mV/s). L'observation d'un pic d'oxydation dans cette gamme de potentiels est caractéristique de la présence de ferrocène.

15

Exemple 13 : premier exemple d'accrochage et décrochage d'une bactérie

Cet exemple montre une mise en œuvre de la présente invention avec un objet biologique.

20 Le protocole d'accrochage de la sonde est celui décrit dans le document référencé [18]. Il s'agit d'immobiliser par électrogreffage des oligonucléotides modifiés (comportant un groupement pyrrole). Les cibles complémentaires biotinylées (0,1µM) ont été hybridées 25 15 minutes à 50°C. Un empilement protéique (avidine / protéine A biotinylée/ anticorps + bactérie) est alors réalisé.

30 Les différentes étapes de l'empilement sont réalisées, soit *in-situ*, soit en solution et l'empilement peut être réalisé élément par élément ou en mélange global. Dans tous les cas, chaque étape

s'effectue par mise en présence des éléments pendant 1 heure et 30 minutes sous agitation et à température ambiante.

Les concentrations utilisées sont de 1mg/ml en 5 Avidine et protéine A et 20mg/ml d'anticorps (AC anti E. Coli). La concentration de la suspension d'E.Coli (DH5 μ) est celle d'une culture d'une nuit (ensemencement de 2ml de milieu de culture LB, Gibco-BRL) concentrée 15 fois. Les étapes de rinçage sont 10 effectuées avec un tampon phosphate salin (PBS pH = 7,4, NaCl = 27mM, KCl = 138mM).

La présence de bactéries est observée sous microscope en lumière blanche.

15 Décrochage électrochimique : le microsystème est connecté à un potentiostat (AutoLab PGstat100, Ecochemie) et par chrono-ampérométrie un potentiel de V = -1,2V, par rapport à une électrode de référence, Ag/AgCl est appliqué au microsystème pendant 4 20 secondes.

Il a été vérifié au préalable que ces bactéries supportent ces conditions électrochimiques. Une goutte de suspension de bactéries marquées à l'Acrydine (indicateur de l'état vivant ou mort) a été déposée sur 25 le microsystème des conditions électrochimiques identiques ont été appliquées et les bactéries ont été observées sous lumière fluorescente.

Celles-ci sont toujours vivantes après application du pH électrochimique.

Après rinçage avec une solution PBS, le microsystème est observé sous un microscope en lumière blanche pour vérifier l'absence de bactéries.

5 **Exemple 14 : deuxième exemple d'accrochage et décrochage d'une bactérie**

Le protocole appliqué dans cet exemple est le même que dans l'exemple 13, sauf que la 1^{ere} partie du protocole, jusqu'à l'empilement, est réalisée suivant 10 l'exemple 8 ci-dessus.

Des résultats équivalents à ceux de l'exemple 13 sont observés.

Exemple 15 : exemple d'accrochage d'un aminoglycanne

15 Cet exemple montre une mise en œuvre de la présente invention avec une molécule biologique d'intérêt pharmacologique.

Des fonctions halogénures (Cl) sont greffées à la surface des microsystèmes suivant le protocole 20 décrit à l'exemple 3 B) (iii).

Les halogénures (Cl) sont mis en présence d'une solution de glucosamine (100mM). La réaction de substitution des fonctions halogénures (Cl) par des fonctions amines est activée par hydroxylation 25 électrochimique (-1,2V, par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl, pendant 7200s, AutoLab PGstat100, Ecochemie).

La présence de sucre est vérifiée par Infrarouge multi-réflections, où des pics 30 caractéristiques des groupements particuliers des sucres, qui sont des liaisons d'un hétérocycle (par

exemple, les liaison C-C, C-O, C-H, O-C-OH, C-N, O-H, N-H, etc.) sont détectés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. Katz & al., pH switched electrochemistry of pyrroloquinoline quinone at Au electrodes modified by functionalized monolayers, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996, 408, 107-112.
- [2] M.N. Yousaf & M. Mrksich, Dynamic substrates : modulating the behaviours of attached cells, *New Technologies for life sciences : A trends guide (Elsevier)*, Dec. 2000, 28-35.
- [3] J.B. Oster (Combinatrix Corporation), Overlaying electrodes for electrochemical microarrays, patent number WO 02/090963 A1, November 14, 2002.
- [4] V. Chechik & al., Reactions and reactivity in SAMs, *Advanced Materials*, 2000, 12(16), 1161.
- [5] E. Kaganer & al., Surface Plasmon Resonance Characterization of Photoswitchable Antigen-Antibody Interactions, *Langmuir*, 1999, 15(11), 3920-3923.
- [6] W.E. Hennink (Universiteit van Utrecht (NL) et Stichting voor de Technische Wetenschappen (NL)), Polymères LCST, brevet numéro EP 1 072 617 A1, 31 janvier 2001.
- [7] M. Yamato et al., Novel patterned cell coculture utilizing thermally responsive

- grafted polymer surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 55(1), 137-140.
- [8] D.J. Revell & al., SA carbohydrate Ms : formation and surface selective molecular
5 recognition, *Langmuir*, 1998, 14, 4517-4524.
- [9] J. Spinke & al., Molecular recognition at SAM : optimisation of surface fictionalisation, *Journal of Chemical Physics*, 1993, 99(9), 7012-019.
- 10 [10] C.D. Tidwell & al., Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, SAMs of alkanethiolates on gold, *Langmuir*, 1997, 13, 3404-3413.
- 15 [11] A.E. Kaifer, Functionalised self-assembled monolayers containing preformed binding sites, *Israel Journal of Chemistry*, 1996, 36, 3899-397.
- 20 [12] B. Piro & al., A polyamide film for dopamine entrapment and delivery, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001, 499, 103-111.
- [13] C.J. Stanley (Affymetrix), Electrochemical denaturation of double stranded nucleic acid, patent number US 6 395 489 B1, May 28, 2002.
- 25 [14] J. Wang & al., On-demand electrochemical release of DNA from gold surfaces, *Bioelectrochemistry*, 2000, 52, 111-114.

- [15] FR-A-2 818 287.
- [16] US 5,919,523.
- [17] WO-A-02/051856.
- [18] FR-A-2 103 359.
- 5 [19] J. Voldmann, et al, Microfabrication in biology and medecine ; *Annu. Rev. Biomed Eng.*, 1999, 01:401-425.
- 10 [20] Hofmann F., et al, (Infineon Technologies); Fully electronic DNA detection on a CMOS chip: device and process issues ; Electron Devices Meeting ; 2002. IEDM '02. Digest. International ; 2002 Page(s) : 488 -491.
- [21] Godillot P. & al, Synthetic Materials, 1996, 83, pp117-123.
- 15 [22] Baueler P et al, *Adv. Mat.*, 1996, 8, 3, pp214.

REVENDICATIONS

1. Dispositif comprenant :

5 - un support ayant une surface comportant une zone d'accrochage (Z) susceptible d'être fonctionnalisée par une sonde (A) capable de se lier à une cible (B) pour l'accrocher ;

10 - une électrode de travail (WE) et une contre électrode (CE) de cette électrode de travail disposées sur le support au voisinage de la zone d'accrochage, dans lequel l'électrode de travail borde ou entoure la zone d'accrochage ;

15 - des moyens permettant d'appliquer un courant électrique ou un potentiel déterminé à ladite électrode de travail de manière à provoquer, lorsque ladite zone d'accrochage et lesdites électrodes sont immergées dans une solution aqueuse, une variation locale de pH au niveau de ladite zone d'accrochage.

20 2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel l'électrode de travail borde ou entoure la zone d'accrochage, et la contre électrode borde ou entoure ladite électrode de travail.

25 3. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel l'électrode de travail, la contre électrode et la zone d'accrochage sont dans une configuration choisie dans le groupe constitué d'une configuration de peigne inter-digité, d'une configuration spirale et 30 d'une configuration concentrique.

4. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les moyens permettant d'appliquer un courant électrique ou un potentiel déterminé à ladite électrode de travail sont des moyens permettant d'appliquer un ou 5 des train(s) de courant ou de potentiel(s) déterminé(s) pendant une ou des durée(s) déterminée(s).

5. Dispositif selon la revendication 1, comprenant en outre une électrode de référence placée 10 de manière à pouvoir mesurer le potentiel appliqué à l'électrode de travail.

6. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la zone d'accrochage est sous la forme d'une 15 électrode.

7. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la zone d'accrochage est fonctionnalisée par une sonde (A) capable de se lier, en fonction du pH, à la 20 cible (B) pour l'accrocher.

8. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel la sonde est telle qu'elle est capable de se lier à la cible pour l'accrocher au moyen d'un 25 groupement électrophile ou nucléophile.

9. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel la sonde est telle qu'elle est capable de se lier à la cible pour l'accrocher au moyen d'un 30 groupement électrophile choisi dans le groupe constitué

des fonctions aldéhyde, halogénure, thiocyanate, isocyanate, ester activé, carbamate, et époxyde.

10. Dispositif selon la revendication 7, dans
5 lequel la sonde est telle qu'elle est capable de se lier à la cible pour l'accrocher au moyen d'un groupement nucléophile choisi dans le groupe constitué des fonctions amine, alcoolate, phénol, phénate, oxyamine et hydrazine.

10

11. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel la sonde est choisie de manière à ce qu'elle puisse former, dans la solution de travail, avec la molécule cible pour l'accrocher, une liaison choisie 15 dans le groupe constitué d'une liaison hydrogène, peptidique, amide, sulfonamide, ester d'acide carboxylique, ester d'acide sulfonique ou silanoate substitué.

20

12. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel la zone d'accrochage est fonctionnalisée par une sonde choisie dans le groupe constitué d'un oligonucléotide, une protéine, un enzyme, un substrat d'enzyme, un récepteur hormonal, une hormone, un 25 anticorps, un antigène, une cellule eucaryote ou procaryote ou des fragments de telles cellules, une algue ou un champignon microscopique.

13. Microsystème électrochimique caractérisé
30 en ce qu'il comprend un ou plusieurs dispositif(s) selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

14. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 dans un procédé destiné à purifier, à concentrer, à cibler ou à 5 détecter une cible ou un objet.

15. Procédé d'accrochage d'une cible (B) présente dans un échantillon aqueux à une sonde (A), ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

10 a) mise en contact de l'échantillon aqueux avec la zone d'accrochage d'un dispositif selon la revendication 1 fonctionnalisée par la sonde (A) capable de se lier, en fonction du pH, à la cible (B) pour l'accrocher ;

15 b) application d'un courant électrique ou d'un potentiel à l'électrode de travail dudit dispositif de façon à modifier localement, au niveau de ladite zone d'accrochage, le pH de l'échantillon aqueux pour que la sonde reconnaissse et se lie spécifiquement à la cible 20 pour l'accrocher.

16. Procédé d'accrochage et de décrochage d'une cible (B) présente dans un échantillon aqueux sur une sonde (A), ledit procédé comprenant les étapes 25 suivantes :

a') mise en contact de l'échantillon aqueux comprenant la cible (B) avec la zone d'accrochage d'un dispositif selon la revendication 1 fonctionnalisée par la sonde (A) pour que la cible (B) s'accroche à ladite 30 sonde ;

b') application d'un courant électrique ou d'un potentiel à l'électrode de travail dudit dispositif de façon à modifier localement, au niveau de ladite zone d'accrochage, le pH de la solution de travail pour que
5 la cible (B) se décroche de la sonde (A).

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel l'accrochage de la cible par la sonde dans l'étape a') est réalisé par application d'un courant
10 électrique ou d'un potentiel à l'électrode de travail dudit dispositif de façon à modifier localement, au niveau de ladite zone d'accrochage, le pH de la solution de travail pour que la cible (B) s'accroche à ladite sonde (A).

15

18. Procédé selon la revendication 15 ou 16, comprenant en outre l'étape suivante, avant ou après l'accrochage de la cible par la sonde :

(*) fixation d'un objet sur la cible.

20

19. Procédé selon la revendication 18, dans lequel l'objet est choisi dans le groupe constitué d'une molécule, d'une cellule ; d'une bactérie ; de billes fonctionnalisées ; d'une protéine ; un
25 oligonucléotide ; d'une enzyme ; d'un anticorps ; d'un fragment biologique ; de molécules à transfacter ; de molécules d'intérêt biologique ; de principes actifs ; de molécules d'intérêt pharmacologique.

30

20. Procédé selon la revendication 18, dans lequel l'objet est un marqueur permettant de détecter

la cible, ledit procédé comprenant en outre un étape de détection de la cible marquée.

21. Procédé selon la revendication 15 ou 16,
5 dans lequel l'échantillon comprenant la cible est sous forme d'une solution aqueuse tamponnée.

22. Procédé selon la revendication 15 ou 16,
dans lequel la cible et la sonde sont des
10 oligonucléotide complémentaires entre eux.

23. Procédé selon la revendication 20, dans lequel la sonde porte une biotine, et la cible est marquée par de la streptavidine-phucoérythrine.
15

24. Procédé selon la revendication 15 ou 16,
dans lequel ledit dispositif est un dispositif selon
l'une quelconque des revendications 7 à 13.

20 25. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 23 dans un procédé destiné à extraire, à concentrer, à cribler ou à détecter une cible ou un objet.

25 26. Utilisation selon la revendication 25, dans laquelle la cible ou l'objet est choisi dans le groupe constitué d'un oligonucléotide, une protéine, un enzyme, un substrat d'enzyme, un récepteur hormonal, une hormone, un anticorps, un antigène, une cellule
30 eucaryote ou procaryote ou des fragments de telles cellules, une algue ou un champignon microscopique.

1 / 4

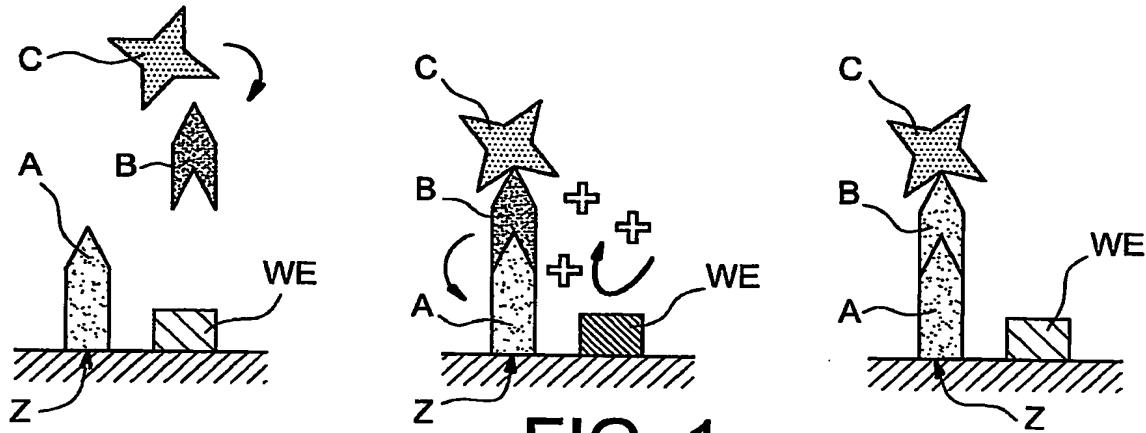


FIG. 1

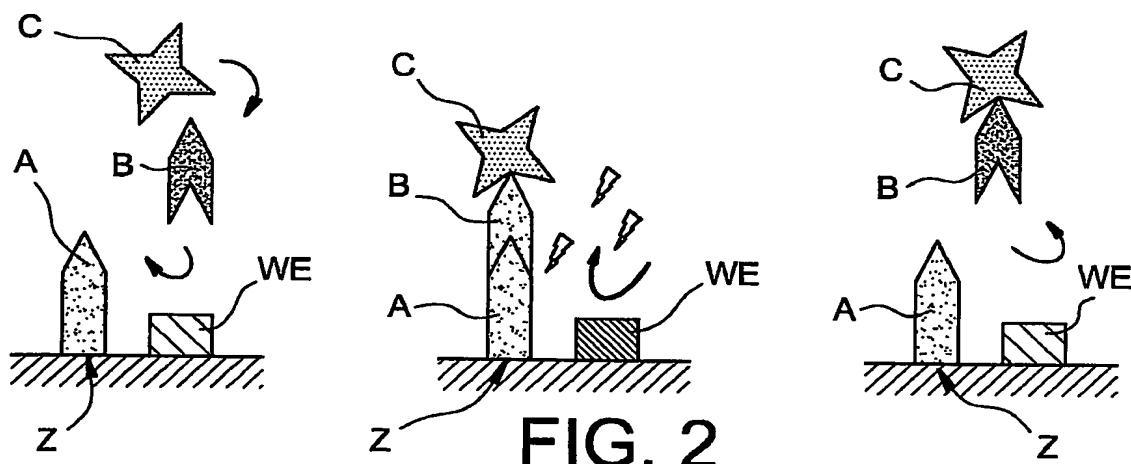


FIG. 2

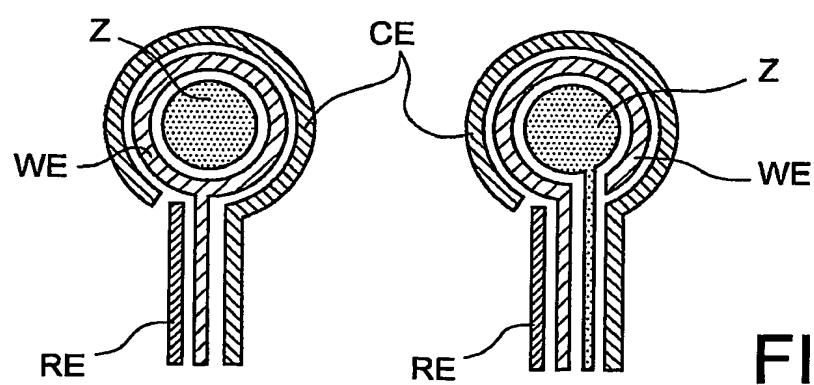


FIG. 3

2 / 4

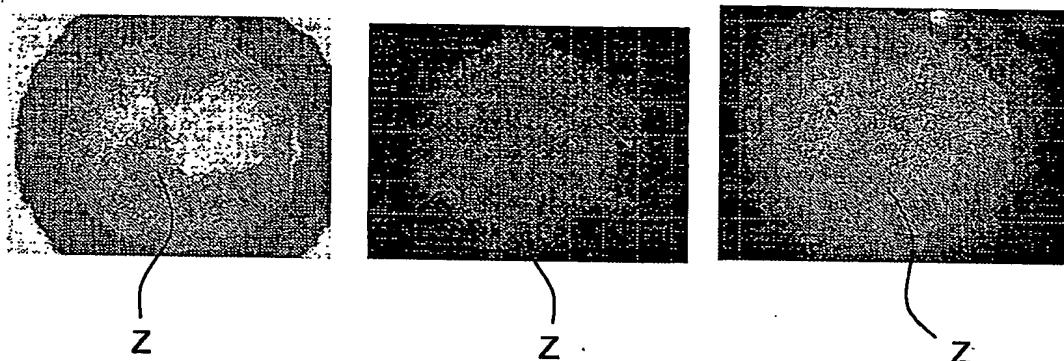


FIG. 4

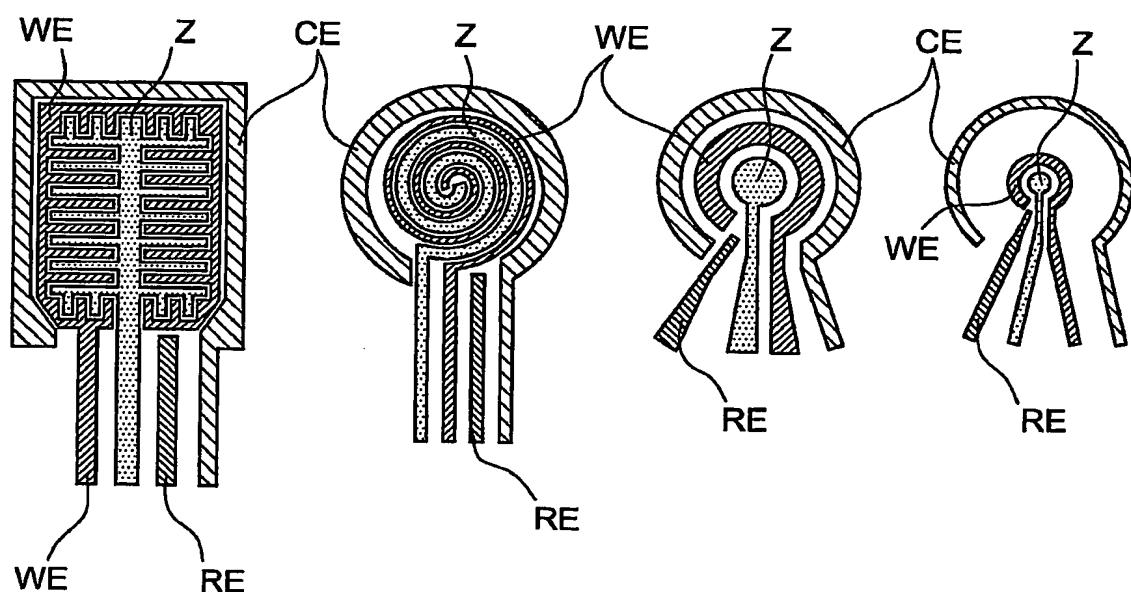


FIG. 5

3 / 4

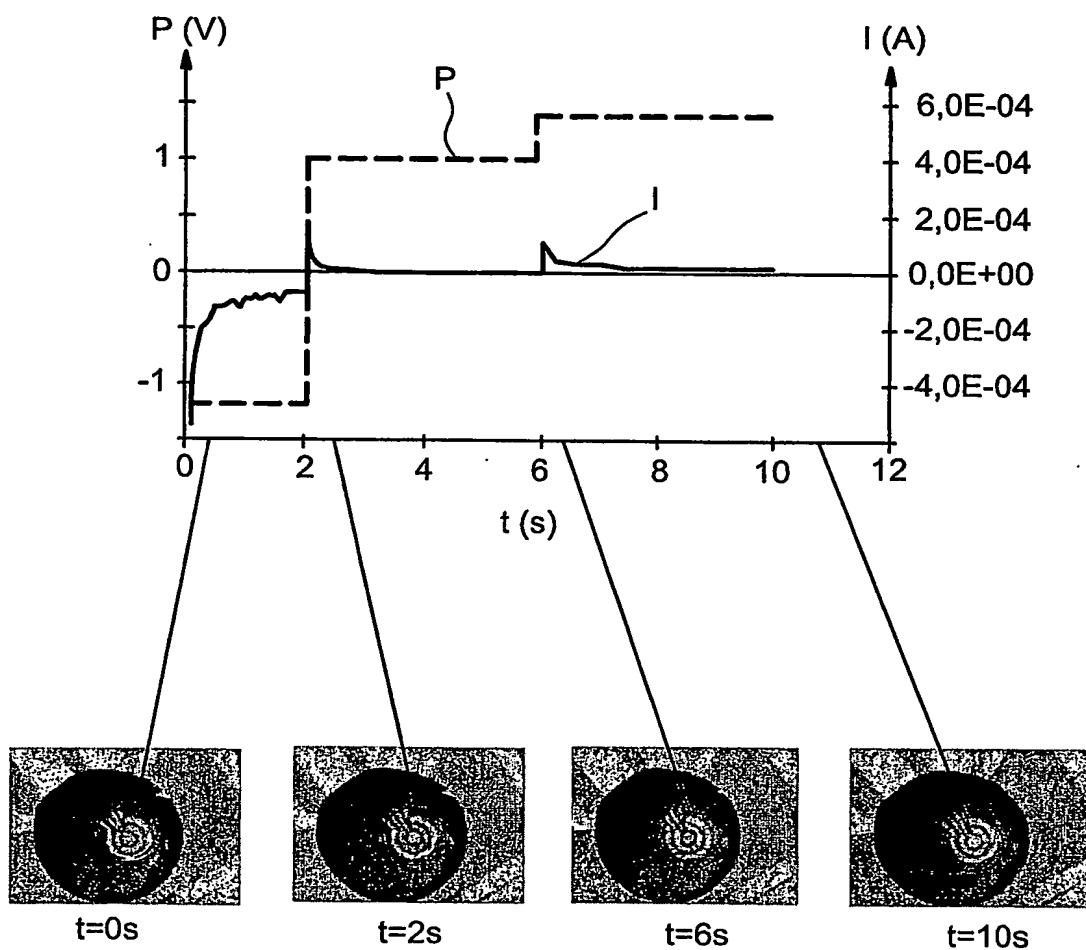


FIG. 6

4 / 4

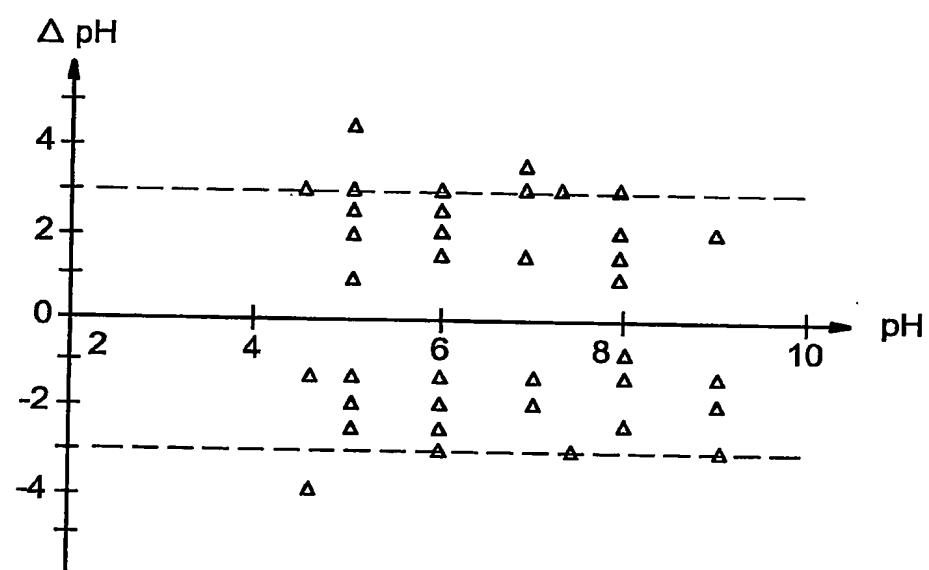


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/53 G01N33/543 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 280 595 B1 (MONTGOMERY DONALD D) 28 August 2001 (2001-08-28) column 5, line 5 - column 6, line 42 column 11, line 30 - column 12, line 49; figures 1-12, 31 ----- WO 99/29711 A (NANOGEN INC) 17 June 1999 (1999-06-17) the whole document ----- US 6 113 768 A (HAGEDORN ROLF ET AL) 5 September 2000 (2000-09-05) column 6, lines 38-47; figures 1-7 ----- -/-	1-4, 6-21, 24-26 1, 2, 6, 13-15, 18, 19, 21, 22, 24-26 1, 2, 4, 6, 14, 15
X		
X		
X		

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the International search report

17 September 2004

01/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050195

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 514 762 B1 (WANG JOSEPH) 4 February 2003 (2003-02-04) column 9, lines 15-52 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050195

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6280595	B1	28-08-2001	US 6093302 A AU 2221699 A CA 2317537 A1 CN 1291350 T EP 1048072 A1 JP 2002501307 T WO 9935688 A1 US 2003050437 A1 US 2003050438 A1		25-07-2000 26-07-1999 15-07-1999 11-04-2001 02-11-2000 15-01-2002 15-07-1999 13-03-2003 13-03-2003
WO 9929711	A	17-06-1999	US 6051380 A AU 738493 B2 AU 1706999 A BR 9814257 A CA 2312568 A1 CN 1284082 T EP 1036085 A1 JP 2001525193 T US 2002085954 A1 WO 9929711 A1 US 2002155586 A1 US 2003190632 A1 US 2003073122 A1 US 2001014449 A1 US 6187642 B1 US 6306348 B1 US - 6569382 B1 US 6518022 B1 US 6403367 B1		18-04-2000 20-09-2001 28-06-1999 03-10-2000 17-06-1999 14-02-2001 20-09-2000 11-12-2001 04-07-2002 17-06-1999 24-10-2002 09-10-2003 17-04-2003 16-08-2001 13-02-2001 23-10-2001 27-05-2003 11-02-2003 11-06-2002
US 6113768	A	05-09-2000	DE 4400955 A1 AT 181259 T WO 9517258 A1 EP 0735923 A1 JP 9511434 T		29-06-1995 15-07-1999 29-06-1995 09-10-1996 18-11-1997
US 6514762	B1	04-02-2003	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/050195

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/53 G01N33/543 B01J19/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 280 595 B1 (MONTGOMERY DONALD D) 28 août 2001 (2001-08-28) colonne 5, ligne 5 – colonne 6, ligne 42 colonne 11, ligne 30 – colonne 12, ligne 49; figures 1-12,31	1-4, 6-21, 24-26
X	WO 99/29711 A (NANOGEN INC) 17 juin 1999 (1999-06-17)	1,2,6, 13-15, 18,19, 21,22, 24-26
X	Le document en entier	
X	US 6 113 768 A (HAGEDORN ROLF ET AL) 5 septembre 2000 (2000-09-05) colonne 6, ligne 38-47; figures 1-7	1,2,4,6, 14,15
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 septembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/10/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Diez Schlereth, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/050195

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 514 762 B1 (WANG JOSEPH) 4 février 2003 (2003-02-04) colonne 9, ligne 15-52 -----	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document de Internationale No
PCT/FR2004/050195

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6280595	B1	28-08-2001	US 6093302 A AU 2221699 A CA 2317537 A1 CN 1291350 T EP 1048072 A1 JP 2002501307 T WO 9935688 A1 US 2003050437 A1 US 2003050438 A1	25-07-2000 26-07-1999 15-07-1999 11-04-2001 02-11-2000 15-01-2002 15-07-1999 13-03-2003 13-03-2003
WO 9929711	A	17-06-1999	US 6051380 A AU 738493 B2 AU 1706999 A BR 9814257 A CA 2312568 A1 CN 1284082 T EP 1036085 A1 JP 2001525193 T US 2002085954 A1 WO 9929711 A1 US 2002155586 A1 US 2003190632 A1 US 2003073122 A1 US 2001014449 A1 US 6187642 B1 US 6306348 B1 US 6569382 B1 US 6518022 B1 US 6403367 B1	18-04-2000 20-09-2001 28-06-1999 03-10-2000 17-06-1999 14-02-2001 20-09-2000 11-12-2001 04-07-2002 17-06-1999 24-10-2002 09-10-2003 17-04-2003 16-08-2001 13-02-2001 23-10-2001 27-05-2003 11-02-2003 11-06-2002
US 6113768	A	05-09-2000	DE 4400955 A1 AT 181259 T WO 9517258 A1 EP 0735923 A1 JP 9511434 T	29-06-1995 15-07-1999 29-06-1995 09-10-1996 18-11-1997
US 6514762	B1	04-02-2003	AUCUN	